

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات
بهداشتی - درمانی قزوین

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

پایان نامه برای اخذ درجه دکترای پزشکی

عنوان پایان نامه:

خواص ضد سرطانی عصاره گیاه دارویی گل راعی

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر حسین پیری

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر فرزاد رجایی

نگارش:

آریان‌دخت سلطان زاده

سال تحصیلی: 1393-1394

تاریخ دفاع: 1393/12/26 شماره ثبت: 1141

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم که شانه هایشان پلکان صعودم در زندگی است و دشواری های فراوان را در
گرو کسب موفقیت هایم تحمل کردند. آنها که دعایشان سرمایه زندگانیم است

و همسر مهربانم

که با کمک ها و حمایت های او این مسیر سخت هموار شد و صبر و بردبایش زمینه ساز تلاشم
بود

تشکر و قدر دانی از

استادارجمند جناب آقای دکترحسین پیری

که با صبوری خویش و کمک هایشان مرا در انجام این رساله راهنمایی نمودند و در حالی
زحمت راهنمایی را متقبل شدند که این پروژه بدون مساعدت ایشان به نتیجه مطلوب نمی رسید.

استادارجمند جناب آقای دکتر فرزاد رجایی

که زحمت مشاوره در این رساله را بر عهده گرفتند و از هیچ کمکی در این مسیر دریغ نکردند.

فهرست مطالب

| صفحه | عنوان |
|---------|--|
| 6..... | چکیده فارسی..... |
| 7..... | فصل اول: مقدمه..... |
| 8..... | بیان مساله..... |
| 9..... | 1-1-مقدمه و اهمیت موضوع..... |
| 11..... | 1-2-کلیات..... |
| 11..... | 1-2-1-گل راعی..... |
| 12..... | 1-2-2-ریخت شناسی گیاه..... |
| 12..... | 1-2-3-محل رویش..... |
| 14..... | 1-2-4-ترکیب های شیمیایی..... |
| 15..... | 1-2-5-گل راعی به عنوان داروی ضد افسردگی..... |
| 18..... | 1-2-6-گل راعی برای درمان ایدز..... |
| 24..... | 1-3-اهداف و فرضیات..... |
| 25..... | فصل دوم:بررسی متون..... |
| 30..... | فصل سوم:مواد و روشها..... |

- 31-3-1- آماده سازی عصاره اتانولی گیاه.....31
- 32-3-2- بررسی اثر ضد سرطانی عصاره ها.....32
- 32-3-3- سنجش توانایی زیستی سلولی با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو.....32
- 33-3-4- سنجش تترازولیوم.....33
- 34-3-5- بررسی آپاپتوز با روش TUNEL.....34
- 35-3-6- جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری.....35
- 36-3-7- روش جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده ها.....36
- 37- فصل چهارم: نتایج و یافته ها.....37
- 38-4-1- نتایج مربوط به محتویات عصاره آبی و عصاره اتانولی گیاه گل راعی.....38
- 39-4-2- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو در تیمار 24 ساعته.....39
- 41-4-3- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو در تیمار 36 ساعته.....41
- 43-4-4- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT در تیمار 24 ساعته.....43
- 44-4-5- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT در تیمار 36 ساعته.....44
- 47-4-6- نتایج بررسی میزان آپاپتوز در سلولهای 4T1.....47
- 53- فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری.....53
- 54-5-1- بحث مربوط به تغییرات غلظت در تاثیر عصاره گل راعی بر سلول های سرطانی کنسر برست.....54

5-2- بحث مربوط به تغییرات زمان در تاثیر عصاره گل راعی بر سلول های سرطانی کنسر برست...54

5-3- نتیجه گیری کلی.....55

5-4- پیشنهادات.....56

فصل ششم: منابع مورد مطالعه.....57

منابع فارسی.....58

منابع انگلیسی.....59

چکیده انگلیسی.....65

فهرست جداول

- جدول شماره 1-محتویات عصاره آبی و عصاره اتانولی گیاه گل راعی.....38
- جدول شماره 2-نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو 24ساعته.....39
- جدول شماره 3-نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو 36ساعته.....41
- جدول شماره 4-نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT تیمار 24ساعته.....43
- جدول شماره 5-نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT تیمار 36ساعته.....44

فهرست تصاویر

- شکل 4-1- مربوط به تست تریپان بلو با غلظت متغیر عصاره گیاه گل راعی.....45
- شکل 4-2- مربوط به تست تریپان بلو با زمان متغیر عصاره گیاه گل راعی.....46
- شکل 4-3- سلولهای 4T1 بدون تیمار.....47
- شکل 4-4- سلولهای 4T1 مواجه شده با آنزیم DNase.....48
- شکل 4-5- سلولهای 4T1 پس از دریافت عصاره با غلظت 25 میلی گرم بر میلی لیتر.....49
- شکل 4-6- سلولهای 4T1 پس از دریافت عصاره با غلظت 50 میلی گرم بر میلی لیتر.....50
- شکل 4-7- سلولهای 4T1 پس از دریافت عصاره با غلظت 100 میلی گرم بر میلی لیتر.....51
- شکل 4-8- سلولهای 4T1 پس از دریافت عصاره با غلظت 150 میلی گرم بر میلی لیتر.....52

چکیده:

طب سنتی در سال های اخیر توسعه زیادی پیدا کرده است. به دلایل گوناگون از جمله گسترش بیماری های مختلف از جمله بیماری های عفونی و سرطان و همچنین وجود عوارض جانبی زیاد همراه با مصرف ترکیبات دارویی شیمیایی و سنتتیک، در حال حاضر تحقیقات در زمینه طب سنتی در حال گسترش می باشد. ترکیبات طبیعی (متابولیت های ثانویه) حاصل از ارگاناسم ها و گیاهان دارویی به عنوان منابع بسیار مهمی برای درمان بیماری های عفونت و سرطان محسوب می گردند. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی اثرات سیتوتوکسیسیته عصاره گیاه هایپرکیم پرفوراتوم روی رده سلولی سرطانی 4T1 بود. به همین منظور، ابتدا نمونه های گیاهی مذکور جمع آوری گردید و در دمای اتاق خشک شد و سپس عصاره های آبی و الکلی آن استخراج گردید. سپس رده سلولی 4T1 با غلظت های 25، 50، 100 و 150 میلی گرم بر میلی لیتر عصاره و با زمان های 24 و 36 ساعت تیمار گردید. پس از آن به کمک آزمایش های مختلف مانند شمارش سلولی به کمک تریپان بلو، تست MTT و تست بررسی آپوپتوز TUNEL، میزان مهار رشد سلولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مذکور به کمک نرم افزار SPSS و به کمک آزمون های آماری¹ (ANOVA) آنالیز گردید. نتایج حاصل نشان داد که میزان مهار رشد سلولی تا حدود زیادی وابسته به دوز می باشد و این میزان به طور کلی از لحاظ آزمون های آماری معنی دار می باشد ولی تفاوت معنی داری بین زمان های مختلف مذکور وجود ندارد.

¹ -Analysis of Variance

فصل اول

مقدمه

بیان مسئله

در سالهای اخیر بشر متوجه عوارض نامطلوب بسیاری از داروهای صناعی شده که نه تنها بر روی خود بیمار اثر نامطلوب گذاشته اند بلکه می توانند بر روی نسل های بعدی نیز اثر بد داشته باشند. بدین جهت توجه و نگرشی جدید نسبت به استفاده از گیاهان دارویی با عوارض کمتر ایجاد شده است. همچنین مطالعه بر روی داروهای کنونی نشان می دهد که اگر چه گیاهان دارویی از لحاظ میزان سهم کمتری را در تهیه دارو ها دارا هستند در عوض داروهای حیاتی همچون داروهای حاصل از تریاک، بلادون، فیزوستیگما، وینبلاستین و تعدادی دیگر از داروهای ضد سرطان موثر از گیاهان تهیه می شوند. استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها یکی از مفید ترین راه ها بوده است که کمترین اثرات جانبی را ایجاد می کند.

1-1- مقدمه و اهمیت موضوع:

سرطان بیماری است که از تکثیر غیر طبیعی سلول های بدن شروع می شود. بدن انسان از میلیون ها سلولی ساخته شده است که با یکدیگر گروه بندی شده تا بافت ها و اندام های مختلف را بسازند. ژن های داخل هر سلول به آن دستورهای لازم را صادر می کنند. گاهی اوقات این دستورات در یک سلول مبهم و مغشوش بوده و سلول رفتار غیر طبیعی دارد و پس از مدتی گروهی از سلول های غیر طبیعی می توانند در خون یا سیستم ایمنی گردش کرده یا تبدیل به توده یا تومور بدخیم یا سرطان شوند. در واقع سلول های بدن در طی یک روند تنظیم یافته از بین میروند و سلول های جدید جای آنها را می گیرند گاهی اوقات این روند طبیعی از تنظیم خارج شده و سلول های فرسوده از بین نمی روند و تشکیل توده ای را می نمایند که می توانند تبدیل به تومور بدخیم یا سرطان شوند.

بیش از دویست نوع متفاوت از بیماری سرطان وجود دارد که هر کدام به شیوه های خاص ایجاد می شوند. چیزی که در همه آنها مشترک است این است که همه آنها به روشی مشابه شروع می شوند با تغییر در ساختار طبیعی یک سلول. تقسیم سلولهای غیر طبیعی تحت کنترل نیستند و معلوم نیست که چه زمانی متوقف می شود یک دسته از سلولهای غیر طبیعی یک تومور نامیده می شود. همه تومورها سرطان نیستند دونهوع تومور وجود دارد، خوش خیم و بد خیم. تومورهای خوش خیم سرطان نیستند. تومورهای بد خیم همان سرطان ها هستند و می توانند به قسمت های مجاور بدن حمله کنند و مانع فعالیت سلولهای سالم آن منطقه شوند. در عین حال سلولهای تومورهای بدخیم می توانند گسترش یافته و به نقاط دیگر بدن دست اندازی کنند و در مکانی دور از محل اولیه تجمعاتی از سلولهای غیر طبیعی را ایجاد کنند. این مرحله را متاستاز مینامند. در سال 2005، در دنیا

7/6 میلیون نفر جان خود را به دلیل ابتلا به سرطان از دست داده اند. در سال 2020، شانزده میلیون نفر به سرطان مبتلا می شوند و در همین زمان، سالانه ده میلیون نفر از این بیماری می میرند. در ده سال آینده در صورتی که اقدامی صورت نگیرد هشتاد و پنج میلیون نفر بدلیل سرطان خواهند مرد. بیش از 70% موارد مرگ و میر ناشی از سرطان در کشورهای دارای درآمد پایین یا متوسط است. اما مشکل واقعی سرطان بیشتر از این اعداد است چرا که یک سوم بیماران دچار افسردگی و اضطراب در حد بالینی هستند و همچنین به دلیل از دست رفتن درآمد و لزوم تامین مخارج درمان، آسیب شدیدی به عملکرد اقتصادی خانواده وارد می شود با این حال، از سرطان می توان رهایی جست زیرا بیش از 40% موارد سرطان قابل پیشگیری هستند و ثلث دیگر بیماران در صورت تشخیص به موقع قابل درمان قطعی می باشند. در بقیه بیماران نیز که غیر قابل درمان هستند، انجام درمان های حمایتی به بهبود کیفیت زندگی بیماران کمک اساسی خواهد نمود. در آخرین آمار در کشورمان، سرطان با 9/4% بعد از گروه بیماریهای دستگاه گردش خون (33/4%) و سوانح مسمومیت و خودکشی (13/4%) به عنوان سومین علت مرگ مطرح گردیده است. در هر سال در کشور حدود صد هزار مورد جدید سرطان بروز می نماید. تفاوت بازاری در نحوه بروز سرطان و میزان آن در مناطق مختلف جغرافیایی کشور مشاهده شده است. در برنامه ریزی ملی مبارزه با سرطان، تحقیقات سرطان دارای نقش اساسی و محوری است. با توجه به هزینه زیاد درمان سرطان در مراحل پیشرفته بیماری، سرمایه گذاری در امر تحقیقات سرطان از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است (1).

1-2-2-کلیات

در سال های اخیر بشر متوجه عوارض نامطلوب بسیاری از داروهای صناعی شده که نه تنها بر روی خود بیمار اثر نامطلوب گذاشته اند بلکه می توانند بر روی نسل های بعدی نیز اثر بدی داشته باشند. همچنین به دلیل علاقه مردم به داروهای گیاهی توجه و نگرشی جدید نسبت به استفاده از گیاهان دارویی با عوارض کمتر ایجاد شده است. مطالعه بر روی داروهای کنونی نشان می دهد که اگر چه گیاهان دارویی از لحاظ میزان سهم کمتری را در تهیه داروها دارا هستند در عوض داروهای حیاتی همچون داروهای حاصل از تریاک، بلادون، فیزوستیگما، وینبلاستین و تعداد دیگری از داروهای ضد سرطان موثر، از گیاهان تهیه می شوند. استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها یکی از مفید ترین راه ها بوده است که کمترین اثرات جانبی را ایجاد می کند. یکی از گیاهانی که امروزه به دلیل خواص بی شمار آن توجه بسیاری را به خود جلب کرده است و تحقیقات زیادی بر روی آن انجام می گیرد گل راعی می باشد و این گیاه در حال حاضر یکی از پر مصرف ترین داروهای گیاهی در سراسر جهان می باشد.

1-2-1-گل راعی:

گفته می شود که گیاه گل راعی نام انگلیسی خود را از نام شوالیه های سنت جان گرفته است که از آن در میدان جنگ های صلیبی برای مداوای زخم استفاده می کردند. این باور وجود داشت که این گیاه دافع ارواح خبیث است و به همین دلیل دیوانگان را وادار به خوردن دمکرده آن می کردند. به دلیل رنگ زرد، آن را موافق مزاج صفراوی می دانستند و برای درمان یرقان و هیستری به کار می بردند. این گیاه علاوه بر این که از نظر خواص دارویی بسیار غنی است، سر شاخه های گل دار آن نیز دارای اسانس نافذی است.

نام علمی: Hypericum perforatum

نام انگلیسی: St Johns Wort

نام فارسی: علف چای، گل راعی، هوفاریقون، گل شهناز

1-2-2-2- ریخت شناسی گیاه:

گیاهی است پایا، فاقد کرک، پایه چوبی، با ساقه ایستاده، در پایین چوبی، ارتفاع گیاه بسته به شرایط محیطی تعیین می شود. برگهای تخم مرغی، دراز، پهن، در سطح زیرین کم رنگ، شامل نقاط شفاف سوراخ مانند با حاشیه ای سیاه و به تعداد فراوان که در واقع کیسه های ترشحاتی مملو از اسانس هستند. از مشخصات آن این است که ساقه های متعدد و منشعب آن دارای دو خط نسبتاً برجسته در تمام طول خود است. گل ها به رنگ زرد درخشان، نسبتاً بزرگ و مجتمع در گل آذین وسیع پانیکولی، دارای پنج گلبرگ می باشد. در گلبرگها نقاط ریز یا خطوط تیره که عبارتند از غده های ترشحاتی محتوی شیر قهوه ای دیده می شود. میوه به صورت کپسول به ابعاد 0,5-1 میلی متر و ریشه به طول 70 سانتی متر می باشد. (2)

1-2-3- محل رویش:

این گیاه در نقاط خشک، مرغزارها و مراتع آفتاب گیر می روید. در بریتانیا به وفور به خصوص بر روی خاک های آهکی می روید. گل راعی اگر چه در زمین های بایر و حاشیه جاده ها می روید ولی علف هرز اختصاصی مزارع چایی است. در ایران این گیاه در نواحی مختلف البرز، کرج، راه چالوس، شمال ایران، گیلان، لاهیجان، طالش، خراسان، مغرب ایران، بروجرد، کوه الوند و نهاوند می روید. (3).

در ایران دارای هفده گونه است ولی تنها گونه با ارزش آن پرفوراتوم می باشد. گل راعی دارای ساقه های علفی و دائمی است و تا ارتفاع بیشتر از یک متر رشد می کند. ساقه های این گونه با ارزش در طول دارای دو برآمدگی است که آنرا از سایر گونه ها متمایز می سازد. منشا گل راعی بیشتر در اروپا، غرب سیبری تا شمال غرب چین، آسیای صغیر، نواحی مدیترانه، شمال آفریقا، کانادا و استرالیا می باشد. مهم ترین ماده موثر گل راعی یک ترکیب کینونی به نام هیپریسین است. ایران رویشگاهی نسبتاً غنی است و بیش از 7500 گونه گیاهی دارد که بسیاری از آنها را گونه های دارویی تشکیل می دهند. رویشگاه های طبیعی ایران به عنوان ذخایر توارثی ارزشمند می توانند منشا تهیه و تولید گیاهان دارویی سازگار و با کیفیت بالا در مزارع قرار گیرند. گل راعی رویشگاه های مختلفی در نواحی شمالی و غربی ایران دارد. در این بررسی که در سالهای 78- 1377 انجام شد نمونه های گل راعی از نواحی گرگان، نوشهر، گیلان و خلخال برداشت و ماده موثر آن (هیپریسین) استخراج و اندازه گیری شد. در بین رویشگاه های مورد بررسی، گرگان و گیلان در سال اول، به ترتیب با 2730 و 2584 قسمت در میلیون هیپریسین و گیلان، گرگان و نوشهر در سال دوم، به ترتیب با 2230، 2218 و 2120 قسمت در میلیون با خلخال (1937 و 1779 قسمت در میلیون) تفاوت معنی داری نشان دادند. چنین به نظر می رسد که در مناطقی با ارتفاع 250 تا 400 متر از سطح دریا و بارندگی 500 تا 900 میلیمتر و خاکی با مواد آلی و معدنی کافی، توان بالقوه تولید هیپریسین بالا باشد.

زمان گلدهی: اواخر اردیبهشت تا اواخر مهرماه

زمان برداشت سرشاخه ها: خرداد تا تیرماه

قسمت مورد استفاده: سرشاخه های گلدار تازه یا خشک شده گیاه سرشاخه ها را باید در زمان گلدهی از گیاه چید. در این هنگام طعم آن تلخ، کمی قابض و به طور ملایم شور است.

اگر در بین انگشتان فشرده و له شود، بوی معطر و رزینی از آن استشمام می شود. برای منظوره‌های درمانی گل را باید زمانی از گیاه جدا کرد که در حال طراوت یعنی قبل از پلاسیده شدن باشند (2).

1-2-4- ترکیب های شیمیایی: این گیاه دارای ترکیبات و مواد شیمیایی مختلفی مانند مشتقات

آنتراکینونی (نفترودیانترون ها)، فلاونوئیدها، فلوروگلوسینول ها، تانن ها، برخی از فنل ها، روغنهای فرار، هیپرفورین و هیپریسین می باشد. استاندارد سازی گیاه و داروهای تهیه شده صنعتی از این گیاه بر اساس دو ماده هیپریسین و پسودوهیپریسین انجام می شود. هیپریسین دارای فعالیت ضد باکتری، ضد ویروسی و ضد التهابی می باشد. این گیاه دارای اسانس روغنی فرار و در حدود 0,5-0,7 درصد از یک نوع گلوکوزید بنام هایپرین می باشد همچنین یک ماده قرمز بنام هایپرین بخصوص در بذر آن مشخص شده، بعلاوه مقدار قابل ملاحظه ای از یک نوع تانن شبیه به تانن چای در برگهای آن وجود دارد در برگها در حدود 1/2 روتین وجود دارد. در گلها 95 / روتین و 1 / کوئرستین وجود دارد مقدار تانن در ساقه های جوان گیاه 3/8 درصد، در برگها 12/4 درصد و در گلها 1/16 درصد می باشد. اثر فیزیولوژیکی گیاه مربوط به وجود اسانس هایپرین، کولین، تانن و نیکوتینیک اسید می باشد (4).

گونه های دیگر این تیره: 1- هایپرکم آندروساموم: دارای اثر درمانی مسهل است و در بیماری های کلیه و مثانه استفاده می شود. 2- هایپرکم لانسئولاتوم: به عنوان یک گیاه دارویی التیام دهنده با اثر مقوی استفاده می شود. از پوست ساقه این گیاه نوعی گم رزین به رنگ زرد مایل به سبز به دست می آید. این ماده با نام بومدا فلورسجانوس و با بویی نامطبوع می باشد. 3- ویسمیا گیانسیس: درخت خون که از آن نوعی شیره رزینی بدست می آید که اثر آن مسهل است. 4- ویسمیا آکومینیت: در آمریکای جنوبی می روید. 5- هارونگامادا گاسکاریینسیس: نوعی ماده رزینی از آن به دست می آید که از آن در نواحی محل رویش جهت

درمان عفونت های زایمانی استفاده می شود (2). رقم توپاز یکی از معروفترین ارقام گل راعی در اروپا است که جهت تولید دارو در مقیاس صنعتی از آن استفاده می شود. در ایران نیز شرکت دارویی زردبند با تهیه بذر رقم توپاز و مطالعات متعددی که بر روی سازگاری و همچنین اثر شرایط اقلیمی کشورمان بر روی آن انجام داده به این نتیجه رسیده که رقم توپاز را می توان در مقیاس وسیع جهت تولید دارو مورد استفاده قرار داد (5).

1-2-5- گل راعی به عنوان داروی ضد افسردگی:

مشکلات و مسائل دنیای ماشینی باعث شده که روز به روز افسردگی در میان افراد بیشتر شود. متأسفانه این پدیده به صورت خفیف، متوسط و یا شدید در افراد مسن و میانسال و در بسیاری از جوانان نیز دیده می شود. افسردگی می تواند بسیاری از عوامل زندگی از جمله فعالیت های روزانه، خوراک، لذت های زندگی تفکرات خوب، تحرک، سلامت جسم و روان، تحصیلات و غیره را تحت تاثیر قرار دهد و در نتیجه فرد افسرده نمی تواند به خوبی از زندگی خود بهره مند شود، به طوری که افسردگی می تواند از طریق اختلالات هورمونی باعث یائسگی زودرس، مشکلات قاعدگی، چاقی، لاغری، مشکلات پوست، ریزش مو و ... شود. خوشبختانه افسردگی قابل درمان بوده و شخص می تواند با درمان های دارویی و غیر دارویی درمان شده و به صورت فردی طبیعی، فعال و خوش بخت درآمد. برای درمان انواع افسردگی، سالیان درازی است که از انواع دارو های ضد افسردگی شیمیایی استفاده می شود ولی چون درمان افسردگی گاهی چندین ماه و یا چندین سال طول می کشد، بنابراین مصرف کنندگان این داروها همیشه از عوارض آن ناراضی و نگران هستند. به همین دلیل در دو سه دهه گذشته تحقیقات وسیعی بر روی گیاهان دارویی ضد افسردگی، آرام بخش و ضد درد صورت گرفته و تعدادی داروی موثر و دارای حداقل اثرات جانبی به بازار های جهانی عرضه شده است که می تواند در بسیاری از موارد، جایگزین دارو های شیمیایی ضد افسردگی شود (6). در حال حاضر یکی از بهترین دارو های گیاهی

ضد افسردگی که دارای خاصیت دارویی و خواص ارزنده دیگری نیز می باشد در مرحله اول و طبق تجربه شربت سودا (عصاره موین) میباشد.

قدمت مصرف این گیاه: قدمت مصرف این گیاه، بیش از دوهزار سال پیش است و نزد بیشتر اقوام و ملل جهان به عنوان بهترین داروی بیماری های عصبی مورد استفاده بوده تا اینکه در حدود یک قرن پیش، برای اولین بار در آلمان از آن فراورده صنعتی تهیه شده و سپس در حدود سه دهه قبل از بیشتر کشورهای اروپایی و امریکا محصولات زیادی از آن به بازار آمد.

از این گیاه در طب سنتی به عنوان ضد التهاب و ورم برونش ها، درمان آسیب مجاری صفراوی، سرماخوردگی معمولی، میگرن، سردرد، درد سیاتیک، زخم معده، مالاریا، شب ادراری، به طور موضعی جهت بریدگی و سوختگی، عفونت های میکروبی و ویروسی و همچنین جهت ایجاد خونریزی های قاعدگی و درمان اختلالات مختلف قاعدگی، رفع ترشحات واژینال (لکوره) و ضد عفونی مجاری ادراری، ادرار آور، ضد درد و ترمیم کننده زخم ضد افسردگی استفاده می شود. شرکت اسانس ا دی او، ژل ترکیبی گل راعی و پانتنول به نام هایپر واژینیتیم را تولید و استفاده آن را در مورد التهابات مخاط واژن کمک به ترمیم مخاط آسیب دیده واژن و سرویکس و هموراید، خشکی مخاط واژن، سطوح زخم، زخم های آفتی، هرپس سیمپلکس و آکنه توصیه میکند و بیان می دارد که عصاره گل راعی موجود در آن اثر ضد باکتریایی و ضد میکروبی موثری بر روی پوست و مخاطات دارد. در ایران نیز این عصاره با ارزش، توسط شرکت دارویی پورسینا با نام تجاری هایپیران به شکل قطره و قرص نروکسین توسط شرکت دارویی دینه تولید می شود. در شهرستان های جلفا و هادیشهر (محل پژوهش) از این گیاه به طور سنتی و به صورت های مختلف جهت درمان انواع عفونت ها مانند واژینوز باکتریال از جمله دمنوش و بخور آن استفاده میشود. این گیاه در مقادیر کم دارویی بدون عارضه است، اما در مقادیر زیاد احتمال

بروز حساسیت به نور و عوارضی مانند التهاب روده و معده و آلرژی به گیاه، خستگی و مشکلات خواب به شکل گذرا و خفیف گزارش شده است. در حال حاضر بیش از پنجاه کارخانه دارو سازی جهان از گیاه علف چای، داروهای مختلف افسردگی تهیه می کنند. در ایران نیز برای اولین بار در سال 1378 از عصاره این گیاه دارویی به شکل قطره و با نام هایپیران، منطبق با استاندارد جهانی و با کیفیتی برابر با انواع خارجی تهیه و به عنوان داروی رسمی ایران شناخته شد. با توجه به این که به طور اساسی و به علت شرایط آب و هوایی، گیاهان دارویی ایران دارای مرغوبیت خاصی می باشند، لذا گل راعی ایران دارای بهترین کیفیت بوده و داروی ساخته شده از آن نیز از کیفیت و استاندارد بالایی برخوردار است (6).

مکانیسم اثر این گیاه در درمان افسردگی: وجود آنزیم مونو آمینو اکسیداز سبب تجزیه هورمونهای آدرنالین و نور آدرنالین در محل سیناپس های عصبی می شود. تجزیه هورمون های مذکور سبب ایجاد افسردگی در افراد می شود. هیپرکسین سبب مهار این آنزیم می شود و به این وسیله افسردگی را درمان می کند.

در اکثر مراجع علمی معتبر نظیر Basic and clinical Martindale و PDR اثر ضد افسردگی این گیاه مورد تأیید قرار گرفته است (5 و 13 و 14 و 15). تحقیقات نشان می دهد که ماده شیمیایی هایپرکسین موجود در گل راعی ممکن است در ابعاد فعالیت ماده هایی به نام MAO² دخالت کرده و آن را به مهار کننده های MAO تبدیل کند. مهار کننده های MAO گروه مهمی از داروهای ضد افسردگی می باشند. در یک پژوهش کوچک در آلمان که پانزده نفر زن به منظور درمان افسردگی تحت معالجه قرار گرفته اند، پس از این که به آن ها گل راعی داده شد به طور محسوس بهبود یافتند، اشتهای آن ها زیاد شد، به زندگی بسیار علاقه مند شدند، اعتماد به نفس خود را باز یافتند و خواب آن ها خوب شد. اما باید توجه داشت که این گیاه درمان فوری برای افسردگی

^۲ - Monoamine Oxidase

نیست و شاید 2-3 ماه طول بکشد(7).

1-2-6- گل راعی برای درمان ایدز:

از اوایل دهه 90 آزمایشات بالینی در خصوص تاثیر هیپرسین در درمان بیماری های ایجاد شده توسط ویروسها صورت پذیرفت و در نتیجه از این گیاه به عنوان یک کاندیدای مناسب برای کنترل بیماری ایدز یاد شده است. آزمایشات در این زمینه نشان می دهد که گیاه با سمیت کم، آثار قابل ملاحظه ای بر ضد، ویروس های مشابه HIV³ دارد. در این آزمایش ابتدا موش های آزمایشگاهی با ویروس هایی که ایجاد بیماری لوکیما می کنند تزریق شد و سپس یک تزریق از عصاره گل راعی انجام شد و این تزریق صد در صد از بروز بیماری در موش جلوگیری کرد. همچنین در آزمایش هایی که عصاره از راه دهان به موش داده شد نیز همین آثار جالب دیده شد. پژوهش ها نشان می دهد که عصاره گیاه از سد خونی مغز عبور می کند که این خاصیت برای درمان ایدز بسیار مهم است. زیرا ویروس ایدز اغلب به مغز حمله می کند. این روش بر روی انسان های مبتلا به ایدز نیز استفاده شده است و نتایج اولیه پژوهش ها که در نشریه اخبار درمان ایدز منتشر شده نشان می دهد که تا به حال آثار مثبتی بر ضد ویروس ایدز دیده شده و بیماران بهبودی محسوسی یافته اند. به این معنی که فعالیت سیستم دفاعی آن ها افزایش یافته، وزن آن ها زیاد شده و انرژی بیشتری یافته اند (7 و 16 و 17 و 18).

1-2-7- بررسی تاثیر گل راعی در درمان سندرم پیش از قاعدگی:

در تحقیقی که بر روی 70 نفر از دانشجویان دانشگاه تهران که مبتلا به سندرم پیش از قاعدگی بودند انجام شد، شرکت کنندگان برای دو سیکل متوالی فرم ثبت وضعیت روزانه را تکمیل کردند و پس از تأیید سلامت جسمی و روانی به طور تصادفی به دو گروه 35 نفری تقسیم شدند و به مدت دو سیکل متوالی با 30 قطره

^۳ - Human Immuno Deficiency Virus

هایپیران دو بار در روز حداقل هفت روز قبل از قاعدگی تحت درمان قرار گرفتند. میزان کاهش شدت علائم سندرم پیش از قاعدگی بعد از مصرف هایپیران 46/45 درصد بود (8). بهداشت پوست: اثر قابض و ضد عفونی کننده گیاه موجب گردیده که از آن در درمان عوارض پوست های چرب استفاده شود. معمولاً پوست صورت اگر چرب باشد، پس از پاک کردن از مواد آرایشی بقایای آن در منافذ پوست که حالت باز شده دارند، باقی می ماند و آن ها را مسدود می کند. برای نظافت کامل این گونه پوست ها، جوشانده پنجاه گرم سر شاخه های گیاه را در یک لیتر آب تهیه کرده و بر روی پوست صورت اثر می دهند و آن را پاک می کنند. جوشانده مذکور از پیدایش چین در پوست صورت جلوگیری می نماید و باعث طراوت آن میشود (2 و 19 و 20 و 21). دارو های تهیه شده از گل راعی عبارتند از قرص پرفوران، قرص روکش دار که هر قرص حاوی حدود یکصد و شصت میلی گرم عصاره خشک گیاه علف چای یا هوفاریقون و معادل سیصد میکروگرم هایپرین می باشد. مهمترین ماده موثره آن هایپرین پسود و هایپرین است. سایر مواد موجود در آن عبارتند از: فلاونوئید، گزانتون ها، اسید های کربو کسلیک، فنولیک.

آثار فارما کولوژی: در مطالعات اولیه نشان داده شده است که عصاره گیاه علف چای انواع ایزو آنزیم A, B آنزیم مونو آمینو اکسیداز (MAO) را مهار می نماید. در نتیجه این اثر میزان واسطه های شیمیایی سروتین، نوراپی نفرین و دوپامین در هسته های مغزی افزایش یافته، موجب بهتر شدن خلق و بر طرف شدن افسردگی می شود. حداقل دو مکانیسم برای اثر ضد افسردگی گل راعی پیشنهاد شده است که عبارتند از: تعدیل فعالیت اینترلوکین و وقفه برگشت سروتونین به عصب.

مطالعات بالینی: در یک مطالعه بالینی بر روی شش زن افسرده 55-65 سال عصاره علف چای که میزان 14٪ استاندارد شده بود به کار گرفته شد و معلوم شد که این عصاره میزان متابولیت های نور آدرنالین و دوپامین

ادرار بیماران تحت درمان را افزایش می دهد. همچنین محققان دریافته اند که افزایش قابل ملاحظه ای در میزان متابولیت های کاتکو لا مین ها، متوکسی هیدروکسی فیل گلیکول که عامل مشخص کننده اثر بخشی در درمان ضد افسردگی است در ادرار این بیماران یافت شده است. مطالعات ادامه دار همین محققین بر روی 22 بیمار دیگر نشان داد که عصاره علف چای به طور قابل ملاحظه ای علائم اضطراب، بی تفاوتی، خواب زباد، بی خوابی، بی اشتها، کندی فعالیت حرکتی و افسردگی را بر طرف می کند و ضمناً آثار جانبی مشاهده نگردید.

قطره هایپیران: این فرآورده از عصاره هیدرو الکلی گیاه علف چای به دست می آید و به شکل قطره در دارو خانه ها موجود است. اثرات درمانی آن عبارتند از آرام بخش، مسکن، ضد اضطراب، مفید در بیماری های میگرن، پرخوابی، مشکلات و دردهای دوران قاعدگی، ترس و دلهره، شب ادراری کودکان می باشد. عصاره این گیاه می تواند میزان اکسیژن سلولی را افزایش می دهد. در دوران قبل از قاعدگی به دلیل بروز تغییرات هورمونی، نوساناتی چون خلق و خو، دردهای ناحیه کمر، دل درد، اسپاسم و سردرد بروز می کند. استرس و اضطراب از جمله عوامل تشدید کننده این عوارض است. شربت گیاهی هایپیران داروی مناسبی برای کاهش هیجانات روحی و تغییرات خلق و خوست. نکاتی که در مورد اثرات ایده آل این دارو واکثر دارو های گیاهی باید در نظر داشت این است که حداقل 2-3 هفته پس از مصرف نباید انتظار اثر داشت چون دارو های گیاهی دیر اثر بوده و اثر آن ها به طور اصولی پس از یک ماه ظاهر می شود و به تدریج به حداکثر می رسد، به علاوه مقادیر مصرف نوشته شده در راهنمای داروهای گیاهی، باید به دقت رعایت شود و همچنین داروهای گیاهی را باید به طور منظم و مرتب مصرف کرد، چرا که مسئله مقدار، مدت مصرف و نظم در مصرف دارو از شرایط اصلی اثر بخشی داروهای گیاهی است. آمارهای تحقیقات کلینیکی نشان داده که رعایت مصرف صحیح هایپیران، بیش از 90 درصد اثرات ایده آل و مثبت به جای گذاشته است. با توجه به بی ضرری هایپیران

وداروهای مشابه آن این دارو در لیست داروهای OTC⁴ بدون احتیاج به نسخه‌قرار گرفته و در همه جای دنیا می‌توان آن را از داروخانه‌ها خریداری کرد. همچنین مصرف طولانی‌هایپیران بدون مشکل است (10).

پماد و کرم هیپریکوم پرفوراتوم: عصاره گیاه گل‌راعی از سرشاخه گل خشک شده و پودر شده و با استفاده از دستگاه سوکسله و حلال متانول تهیه می‌شود. برای بررسی اثر این پماد به عنوان ضد التهاب و التیام بخش، پمادهایی با غلظت عصاره 3-5 درصد انتخاب و پس از مشخص نمودن روش تعیین مقدار عصاره در فرآورده‌ها جهت بررسی اثر آن تعداد 20 موش ماده با محدوده وزنی 200-250 گرم انتخاب شد. دو روز پیش از ایجاد سوختگی موی ناحیه پشت نمونه‌ها تراشیده شد. این نمونه‌ها به چهار گروه پنج‌عضوی تقسیم شدند. گروه اول تحت درمان با پماد سه درصد، گروه دوم پماد پنج درصد، گروه سوم به عنوان شاهد تحت درمان با پلاسیبور، گروه چهارم به عنوان مقایسه استاندارد تحت درمان با کرم فنی توئین یک درصد قرار گرفتند. جهت ایجاد سوختگی پس از بیهوشی ناحیه تراشیده شده پنج ثانیه در آب جوش 965 درجه به صورت معلق قرار گرفت که باعث ایجاد سوختگی درجه سه شد. درمان در دو دوره و هر یک در یک هفته صورت گرفت. در هفته نخست هر روز نمونه‌ها در دو نوبت و در هفته دوم در یک نوبت دارو دریافت کردند. نمونه‌های شاهد دارای افزایش تدریجی شدت التهاب، نکروز، لاغر شدن شدید، عطش فراوان، بی‌حرکتی، گسترده شدن مناطق آسیب دیده و عفونت بودند. در نهایت به مرگ آن‌ها در روز دوازدهم منجر شد. سایر نمونه‌ها به تدریج با کاهش التهاب و التیام مناطق آسیب دیده، سیر بهبودی را طی کردند. در این پژوهش نشان داده شد که پماد گل‌راعی با غلظت سه درصد تا حدودی بهتر از غلظت پنج درصد عمل می‌کند، که این امر از نظر اقتصادی دارای اهمیت بسیار است. همچنین اختلاف معنی‌داری بین اثرات التیام بخش پماد سه درصد و کرم یک درصد فنی

⁴-Over The Counter

توئین دیده نشد(11).هایپر فورات: اثر هایپرسین تغلیظ شده در دی کلرو متان و متانول در کاهش زخم معده تجربی حاصل از استیل سالسیلیک اسید و اتیل الکل 96 درجه در معده موش صحرایی.هایپرسین با مقادیر مختلف به صورت وابسته به دوز جلوی ایجاد زخم توسط ایندو متاسین را می گیرد و در ثانی در حیواناتی که قبلاً توسط این ماده پیش مداوا شدند و سپس در آن ها اقدام به ایجاد زخم گوارشی توسط ایندو متاسین میشد تا حد قابل توجهی در برابر زخم گوارشی مقاومت نشان می دادند. پس این ماده جلوی زخم زایی این دو متاسین را می گیرد و این کار را با افزایش ترشح موکوس معدی انجام می دهد. همچنین ممکن است این دارو روی سنتز پروستا گلانتوسین ها و میکروسیرکولاسیون مخاط معده تاثیراتی داشته باشد(11و22و23و24و25).

1-2-8- فرآوری اسانس گل راعی: در نقطه های روشن برگ غده هایی وجود دارد که مملو از شیره قرمز رنگ مایل به قهوه ای است. در اروپا از این شیره به عنوان موثرترین دارو برای التیام زخم ها، سوختگی و مالیدن به قسمت هایی که از بدن که پوست آن ها کنده شده است استفاده می شود(12).

روغن گل راعی: روغن گل راعی که یک روغن قرمز رنگ می باشد از قرار دادن گل در در روغن آفتاب گردان، روغن گردو و یا روغن زیتون و با قرار دادن در برابر آفتاب به مدت چند هفته به دست می آید. این روغن را می توان روی سوختگی، التهابات پوستی، عضلانی و بافت همبند مالید و برای درمان نورالژی به کار برد(13و26و27و28).

خشک کردن: برای خشک کردن گیاه باید آن ها را به صورت دسته های مجزا در آورد و سپس بر روی طناب آویخت. یا اینکه سر شاخه ها را به صورت قشر نازکی بر روی سطح زمین در محل خشکی گستراند تا بدون فاسد شدن خشک شوند. اگر عمل خشک کردن با دقت و سرعت انجام شود، گل ها، رنگ زیبا و طعم خود را حفظ می کنند (14و29و30و31). خشک کردن صنعتی گل راعی در دمای حداکثر 55 درجه و در تاریکی کامل

انجام می شود. (حتی چند ساعت نور می تواند مقدار ماده شیمیایی فعال را کاهش می دهد(15و32و33و34).

فاکتور های ایمنی: مهار کننده های MAO در ترکیب با بعضی خوراکی ها ممکن است در ابعاد خطرناکی فشار خون را بالا ببرد و علائم آن سردرد، سفتی گردن، آشفته گی و سردی پوست بدن می باشد. البته قدرت تاثیر گیاه در مقدار مجاز به قدرت مهار کننده های دارویی تجاری نیست ولی توصیه می شود اشخاصی که از این گیاه استفاده می کنند نباید از دارو های Amphetamines و مخدرها، واز اسیدهای آمینه Tryptophan, Tyrosine و قرص های ضد بار داری، بخور های ضد آسم، داروهای سرما خوردگی استفاده نکنند(35و36و37و38). در مواردی که چای کوهی به عنوان علوفه دارویی به دام ها داده می شود ماده شیمیایی هایپیرسین زیر پوست دام جمع می شود و زیر تابش اشعه آفتاب ایجاد سوختگی و تاول می نماید. حتی در مواردی که به جانوران آزمایشگاهی به مقدار زیاد ماده شیمیایی هایپیرسین تزریق شده و زیر تابش اشعه آفتاب قرار داده شده اند، مرده اند. ولی تحقیقات دانشمندان نشان می دهد مصرف این گیاه برای انسان در صورتیکه در حد مجاز توصیه شده، مصرف شود ایجاد عوارض پوستی نمی کند، مگر در افرادی که دارای پوست های حساس باشند. به همین دلیل اشخاصی که از این گیاه استفاده می کنند شبیه به اشخاصی که از آنتی بیوتیک تترا سایکلین استفاده می کنند باید حتی الامکان دور از تابش اشعه آفتاب باشند(7و39و40و41).

تداخلات دارویی: استفاده طولانی مدت این گیاه می تواند فعالیت دارو های حیاتی مانند مهار کننده های پروتئاز برای HIV و دارو های ضد وازنش پیوند را که بعد از پیوند اعضا مورد استفاده قرار می گیرد، بلاک نماید. در یک مطالعه بر روی 86 بیمار، بعد از دریافت گل راعی، در برخی از بیماران وازنش پیوند رخ داد و سایر بیماران مجبور شدند دوز این داروی گران قیمت را افزایش دهند(16و42و43و44).

1-3-اهداف و فرضیات (Objective and Hypothesis):

الف_هدف اصلی طرح (General Objective):تعیین خواص دارویی عصاره گیاه دارویی گل راعی در

زمینه کاهش بیماری های انسانی از جمله سرطان.

ب_اهداف فرعی (Specific Objectives):

_ تعیین غلظت مناسب عصاره گیاهی سرشاخه های هوایی گل راعی کاهش سلول های سرطانی.

_ تعیین زمان اثر مناسب استفاده از عصاره گیاهی سر شاخه های هوایی گل راعی در کاهش درصد سلول های

سرطانی زنده.

ج_اهداف کاربردی (Applied Objectives):

_پیوند دادن طب سنتی ایران با دستاورد های تکنولوژیکی و علوم دارویی روز در صورت اثبات مثمر به ثمر

بودن عصاره سرشاخه های هوایی گل راعی.

د_فرضیه ها (Hypothesis) یا سوال های پژوهش:

_عصاره سر شاخه های هوایی گل راعی قدرت بازدارندگی بیشتری نسبت به گروه کنترل در مقابل تکثیر سلول

های سرطانی دارد.

فصل دوم

بررسی متون

اهمیت استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری ها و ممانعت از رشد باکتریهای پاتوژن به خوبی شناخته شده است. ولی با وجود تنوع بسیار زیادی که این نوع گیاهان چه در سطح جهانی و یا منطقه در کشور دارند و همچنین ظهور بیماری ها و عوامل بیماری زای جدید مطالعه و تحقیق در این مورد ادامه دارد. با صنعتی شدن جوامع بشری شمار مبتلایان به سرطان رشد چشمگیری داشته و استفاده از دارو های ضد سرطان در درمان بیماران مبتلا به سرطان کاربرد وسیعی پیدا کرده است (17 و 45 و 46). پلی فنل ها انواعی از آنتی اکسیدان ها هستند که در جلوگیری از بسیاری از بیماری ها از جمله سرطان نقش دارند. این ترکیبات بسیار متنوع هستند و اثرات متفاوت دارند. ترکیبات فنلی شامل ویتامین ها، رنگدانه ها و فلاونوئید ها و ویژگیهای ضد جهشی و در نتیجه ضد سرطانی و همچنین فعالیت کاهش قند خون را دارند (18 و 47 و 48 و 49). سرطان پستان شایع ترین سرطان در زنان 40 تا 44 ساله میباشد. این سرطان عامل سی درصد در صد تمام سرطان های زنان و بیست درصد مرگ و میر ناشی از سرطان می باشد. شیوع سرطان پستان در کشور های در حال توسعه در حال افزایش است و در بسیاری از نقاط دنیا به صورت شایع ترین بیماری بدخیم در بانوان در آمده است. به طوری که آمار جهانی نشانگر ابتلای سالانه یک و نیم میلیون نفر در سراسر جهان بوده و میزان مرگ و میر ناشی از آن سالانه 50200000 گزارش کرده اند. سرطان پستان در ایران کمتر از نقاط دیگر آسیا بوده است. در حالی که در طی دهه های اخیر شیوع این سرطان در زنان ایرانی رشد بالایی داشته است که نگران کننده میباشد. علاوه بر آن در زنان ایرانی حداکثر سن ابتلا به سرطان پستان حدود یک دهه کمتر از زنان در کشور های پیشرفته می باشد. شیمی درمانی یکی از مهم ترین روشهای درمانی برای سرطان می باشد. اثرات جانبی یکی از ملاحظات عمده طب غربی برای ترکیبات ضد تومور می باشد. با وجودیکه پزشکی گیاهی یک امتیاز قابل تحسین بر ترکیبات صناعی دارد، برای آنکه آنها دارای عناصر طبیعی هستند و اثرات منفی کمتری دارند (19 و 50 و 51).

مطالعات اپیدمیولوژی پیشنهاد میکنند که مواد غذایی غنی از میوه ها و سبزیجات بر روی سرطان های مختلف از جمله سرطان کولون اثر باز دارنده دارند (20 و 52 و 53). امروزه یکی از بهترین آنتی اکسیدانهای طبیعی، ترکیبات فنلی گیاهان می باشند (21 و 54 و 55 و 56). آنتی اکسیدانهای پلی فنلی یک گروه ویژه از متابولیت های ثانویه را تشکیل می دهند که نقش مهمی در حفاظت بافت ها در مقابل اثرات اکسید کنندگی رادیکال های آزاد اکسیژن و سایر گونه های فعال ایفا میکنند، به طوری که از بروز بیماری های متعددی از جمله بیماری های التهابی، سرطان، دیابت، سکته قلبی، آلزایمر و پارکینسون جلوگیری مینماید (22 و 23). متاستاز یکی از بزرگترین مشکلات درمان سرطان پستان می باشد مدل سازی این مرحله از سرطان در حیوان آزمایشگاهی امکان بررسی مسیر های سلولی درگیر و همچنین سنجش اثر بخشی دارو های جدید را امکان پذیر میسازد. مدل موشی سرطان پستان، امکان شبیه سازی مرحله IV سرطان پستان در موش مشابه سرطان پستان انسانی را فراهم می نماید تهیه مدل موشی با کمک رده سلولی 4T1 برای مطالعه سرطان پستان در مراحل دیررس و ارزیابی داروهای سرطان و سایر ترکیبات درمانی مفید خواهد بود (24 و 25). اولین بار توسط میلر و همکارانش در انستیتو سرطان کارمانس این رده سلولی از تومور پستانی که خود به خود در موش BALB/C⁵ ایجاد شده بود به دست آمده است (26 و 57 و 57 و 58). بنابراین در جریان تزریق آن به موش، مشکلات تزریق رده سلولی توموری انسان به موش (رشد آهسته، متاستاز نامناسب و مشکلات دیگر) بر طرف می شود (27 و 59 و 60). انجام این تحقیق به منظور ارزیابی تاثیر عصاره اتانولی گیاه دارویی گل راعی در مهار تکثیر سلول های سرطانی و بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره این گیاه می باشد. استفاده وسیع و طولانی مدت از آنتی بیوتیک ها، کورتون ها و دارو های سرکوب گر ایمنی عوارض جانبی وسیعی را در بیماران ایجاد کرده اند اما گیاهان

⁵ -BALB/C IS an albino, Laboratory bred strain of the house mouse from which a number of common substrains are derived

دارویی منابع ارزشمندی هستند که امروزه مورد توجه کشور های پیشرفته جهان قرار گرفته و به عنوان مواد اولیه جهت تبدیل به داروهای بی خطر برای انسان تلقی می شوند (28 و 61 و 62). هیپرفورین، یک محصول طبیعی از مخمر سنت جان (علف چای پرفوراتوم L)، دارای تعداد زیادی از فعالیتهای دارویی، از جمله antidepressive و خواص ضدباکتری است. علاوه بر این، هیپرفورین خواص ضدتوموری در برابر خطوط مختلف سلولتوموری دارد. در این مطالعه در حال حاضر سنتز مشتقات هیپرفورین با بهبود فعالیت فارماکولوژیک آن را مورد بررسی قرار گرفته است. ترکیبات سنتز برای حلالیت و ثبات خواص آنها مورد آزمایش قرار گرفتند. آنها همچنین برای خواص ضدتوموری خود مورد بررسی قرار گرفتند (هردو در شرایط آزمایشگاهی) یکی از مشتقات هیپرفورین، Aristoforin، در محلول آبی از هیپرفورین محلولتر است و علاوه بر این بسیار باثبات است. نکته مهم، در آن حفظ خواص ضدتوموری بدون ایجاد سمیت در حیوانات آزمایشگاهی است. این داده ها به شدت نشان میدهد که Aristoforin به عنوان یک داروی ضدسرطان کاربرد دارد (29 و 71 و 72 و 73 و 74). مخمر سنت جان (علف چای پرفوراتوم) برای فعالیت ضد افسردگی آن مورد بررسی قرار گرفت اما در برنامه های کاربردی پوستی نیز قدمت طولانی مدت داشته است. آماده سازی مخمر موضعی سنت جان مانند روغن یا تزریق برای درمان زخم جزئی و سوختگی، آفتاب سوختگی، خراش، کبودی، contusions، زخم، درد عضلانی، و بسیاری دیگر استفاده می شود. پژوهش دارویی از استفاده در این زمینه از ترکیبات، naphthodianthrone (به عنوان مثال، هیپریسین) و phloroglucinols (به عنوان مثال، هیپرفورین) دارای پروفایل های دارویی جالب، از جمله آنتی اکسیدان، ضد التهاب، ضد سرطان، و فعالیت های ضد میکروبی است. علاوه بر این، هیپرفورین تحریک رشد و تمایز سلول های کراتینوسیت، و هیپریسین photosensitizer که میتواند برای درمان انتخابی در

سرطان پوست nonmelanoma استفاده شود. با این حال، تحقیقات بالینی در این زمینه هم کم است. به تازگی، مطالعات پراکنده در بهبود زخم، درماتیت آتوپیک، پسوریازیس، و عفونت هرپس سیمپلکس، تا حدودی با ترکیبات خالص و فرمولاسیون پوست مدرن انجام شده است. مخمر سنت جان نیز دارای پتانسیل برای استفاده و مراقبت از پوست در پزشکی کاربرد دارد. ترکیب و ثبات از فرمولاسیون های دارویی متفاوت تا حد زیادی بسته به منشأ مواد گیاهی، روش تولید، لیپوفیلیسیته حلال، و شرایط ذخیره سازی، و این باید با توجه به اهداف عملی و علمی در نظر گرفته شود (30 و 63 و 69 و 70). در مطالعه ای تحت عنوان تاثیر عصاره گل راعی در درمان سرطان، متدهای تهیه و دوز موثر درمانی آن در درمان سرطان مثانه بررسی گردید. در این مطالعه عود سلول های سرطانی در کانسر مثانه تحت بررسی قرار گرفت که در افراد بیمار طول متوسط دوره درمان با عصاره گیاه چای هفت و نیم ماه بود این در حالی است که طول درمان بدون استفاده از عصاره گیاه چای 9/8 بود همچنین عوارض جانبی جدی هم گزارش نشد (32 و 66 و 67 و 68) ریتا کلیمن و همکارانش اثر هایپرپسین را بر روی از بین رفتن سلولهای متاستاتیک ملانوما بررسی کردند. ملانوم تومور متاستاتیک و تهاجمی است که به درمان مقاوم می باشد. هایپرپسین به دلیل خاصیت ضد سرطانی قوی آن در آزمایشگاهها به کار می رود. هایپرپسین به دلیل اثر سیتوتوکسوسیتی سلول های سرطانی را از طریق مکانیسم های مختلف از جمله آپتوز، نکروز و آتوفازی از بین میبرد. در این روش درمانی پنجاه درصد سلولهای ملانوما از بین رفتند. (33 و 64 و 65)

فصل سوم

مواد و روشها

روش اجرا و طراحی تحقیق

نمونه های گیاهی جمع آوری شد و از هر کدام نمونه های هرباریومی تهیه گردید و سپس مورد شناسایی قرار گرفت. ما بقی نمونه ها برای شناسایی آکالوئید، فلاونوئید و آزمایشات ضد سرطانی آماده شد.

3-1- آماده سازی عصاره اتانولی گیاه: در این تحقیق از اتانول 70 درجه و روش پرکولاسیون استفاده شد. بدین ترتیب که پنجاه گرم از پودر نمونه های گیاهی مورد نظر را داخل دکانتور ریخته سپس مرحله به مرحله به آن اتانول 70 درجه اضافه نمودیم. برای اضافه کردن اتانول ابتدا آن را گرم و سپس به داخل دکانتور انتقال دادیم. افزودن اتانول را تا جایی ادامه دادیم که تمامی حجم گیاه داخل دکانتور خیس شد. برای عصاره گیری کامل بسته به نوع اندام (برگ، ساقه، ریشه) مدت 24 تا 48 ساعت زمان لازم بود. در این حالت پودر گیاه بهتر می تواند حلال را در خود جذب نماید تا حد اکثر مواد موثره در اتانل حل شود. پس از عصاره گیری عمل جدا سازی حلال از عصاره توسط دستگاه روتاری انجام شد (71 و 72).

رقیق سازی عصاره گیاهان: هر یک از عصاره ها را با پروپیلن گلیکول رقیق کرده و علاوه بر عصاره خالص، غلظت های 100، 50، 25 و 150 میلی گرم بر لیتر از عصاره تهیه شد.

شناسایی فلاونوئید ها: یک گرم پودر گیاهی با ده میلی لیتر متانول به مدت ده دقیقه رفلاکس و صاف گردید و سپس با آب رقیق و با پترولیوم اتر دکامنه شد. فاز زیرین تغلیظ و در اتیل استات حل و جهت آزمایش های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش ویلسون تابوک: یک قسمت نمونه تهیه شده تغلیظ و ده قطره استن و اسید بوریک و اسید اگزالیک مجدداً تغلیظ و زیر لامپ UV قرار گرفت ظهور رنگ زرد که نشانه وجود فلاونوئید است مشاهده گردید. شناسایی آکالوئید نیز با استفاده از معرف مایر شناسایی شد.

3-2- بررسی اثر ضد سرطانی عصاره ها: بررسی خواص ضد سرطانی رقت های مختلف عصاره گیاه

دارویی گل راعی با استفاده از لاین سلولی و مطابق پروتکل زیر انجام شد رده سلولی 4T1 که مشتق از سرطان پستان است، از بانک سلولی انسیتوپاستور ایران تهیه شد. سلول ها در محیط High glucose DMEM حاوی ده درصد سرم جنین گاو، پنج درصد اسید های آمینه غیر ضروری و آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور 37 درجه سانتیگراد حاوی دی اکسید کربن پنج درصد کشت شد. بررسی های مورد نیاز بر روی رده سلولی تازه از ازلت مایع خارج شده انجام خواهد گردید.

3-3- سنجش توانایی زیستی سلولی با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو: تعداد 1×10^4 سلول در هر

ول کشت شد و سپس پلیت 24 ساعت به منظور اتصال سلول ها به کف پلیت در انکوباتور قرار گرفت. محیط رویی سلول ها خارج و محیط فاقد سرم حاوی غلظت های 25 و 50 و 100 و 150 میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره گل راعی به هر چاهک اضافه و پلیت به انکوباتور منتقل گردید. پس از مدت 24 و 36 ساعت، تمام خانه های پلیت تریپسین زنی شد. سپس با اضافه کردن محیط کشت کامل، تریپسین غیر فعال شد و نسبت یک به یک تریپان بلو چهار درصد به هر خانه اضافه گردید و پلیت به مدت دو دقیقه در انکوباتور 37 درجه سانتیگراد انکوبه شد. شمارش سلول ها با استفاده از لام نئوبار (در خانه های متعلق به شمارش گلبول های

سفید) انجام گرفت. سلول های رنگ نگرفته به عنوان سلول های زنده در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از فرمول زیر، درصد حیات سلول ها در غلظت محاسبه شد.

$$100 \times \frac{\text{تعداد کل سلولها}}{\text{تعداد سلولهای زنده}} = \text{توانایی زیستی سلولها}$$

3-4- سنجش تترازولیوم (MTT): اساس این تست شکسته شدن نمک زرد رنگ تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول های زنده و تولید بلور های بنفش رنگ و نامحلول فورمازان است. هر چه تعداد سلول های زنده بیشتر باشد شدت رنگ تولید شده نیز بیشتر خواهد بود و بالعکس. برای انجام این تست تعداد ده هزار سلول در هر چاهک پلیت 96 خانه کشت و به مدت 24 ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط رویی خارج و هر چاهک دوبار توسط PBS⁶ شسته شد. سپس صد میکرو لیتر محیط کشت فاقد سرم حاوی غلظت های 150, 100, 50, 25 میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره گل راعی به هر چاهک پلیت اضافه و پلیت به مدت 24 و 36 ساعت انکوبه شد. پس از آن محیط هر چاهک با صد میکرو لیتر محیط فاقد سرم تازه جایگزین گردید. به هر یک از چاهک ها ده میکرو لیتر محلول MTT با غلظت پنج میلی گرم بر میلی لیتر اضافه و به مدت چهار ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتیگراد انکونه شد. سپس محیط رویی هر چاهک تخلیه و به منظور حل شدن بلورهای فورمازان صد میکرو لیتر دی متیل سولفوکساید DMSO به هر یک از آنها اضافه و به مدت دو ساعت در دمای اتاق و در مکانی تاریک قرار داده شد. سپس محتوای هر چاهک دیگر منتقل و جذب نوری OD⁷ هر چاهک در طول موج 492 نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا (ELISA reader) قرائت و درصد حیات سلول ها در مورد هر غلظت محاسبه شد.

⁶-Peripheral blood smear

⁷-Optical Density

3-5- بررسی آپاتوز با روش TUNEL: اساس این تست شکستن DNA ژنومی در طی آپاتوز منجر به ایجاد فراگمنت های دو رشته ای با وزن مولکولی کم (مونو و اولیگو نوکلئوتیدها) علاوه بر شکستگی های تک رشته ای (nicks) در DNA های آسیب دیده مذکور می تواند توسط نشاندار کردن انتهاهای 3-OH نوکلئوتیدهای تغییر یافته در یک واکنش آنزیمی شناسایی گردد.

مراحل انجام تست: پلیتهای کشت سلولی 96 خانه که حاوی گروههای سلولی مورد مطالعه مذکور بود از انکوباتور خارج شد و مراحل زیر بر روی آن انجام گرفت: 1- ابتدا محیطهای کشت سلولی موجود در هر چاهک برداشته شد. 2- پس از خشک شدن سطح چاهکها، محلول فیکس کننده افزوده شد و به مدت یک ساعت در دمای 15-25 درجه سانتی گراد انکوبه شد. 3- بعد از این مدت، با استفاده از PBS چاهکها شستشو شدند. 4- محلول نفوذپذیر کننده افزوده شد و به مدت دو دقیقه در یخ قرار داده شد. 5- سپس دوباره با PBS شسته شد. 6- اطراف نمونه ها خشک گردید. 7- به هر چاهک پنجاه میکرو لیتر مخلوط واکنشی TUNEL اضافه گردید (توجه: برای نمونه کنترل منفی پنجاه میکرو لیتر محلول نشاندار کننده اضافه گردید) 8- پوشش پلیت را بر روی آن قرار دادیم و به مدت 60 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد در یک محیط مرطوب تاریک (انکوباتور) قرار داده شد. 9- سه بار پلیتها با استفاده از PBS شسته شد. 10- به هر یک از چاهکها رنگ، پروپیدیوم یدید (Propidium Iodide) با غلظت ده میکرو گرم بر میلی لیتر افزوده شد. 11- سپس با استفاده از PBS شسته شد. 12- نهایتاً با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Nikon) گروههای مختلف سلولی موجود در چاهکهای پلیت مورد بررسی قرار گرفتند.

3-6- جامعه مورد مطالعه و روش نمونه گیری: روش نمونه گیری به روش میدانی (جمع آوری گیاهان

دارویی) بود. همچنین رده سلولی 4T1 که مشتق شده از سلولهای سزطان پستان موش می باشد جهت بررسی اثر متغیر مستقل (زمان و غلظت عصاره های گیاه گل راعی) بر متغیر وابسته (سلولهای سرطانی مذکور) استفاده گردید.

گروه های مورد مطالعه: گروه های سلولی مورد مطالعه شامل موارد زیر است.

گروه 1: گروه کنترل منفی (سلول هایی که عصاره دریافت نمکنند)

گروه 2: گروه کنترل مثبت (سلول هایی که عصاره دریافت نمیکنند و در زمان انجام تست TUNEL به آنها آنزیم DNase افزوده می گردد

گروه 3: گروه تیمار 24 ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 25 میلی گرم بر مول دریافت میکنند)

گروه 4: گروه تیمار 24 ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 50 میلی گرم بر مول دریافت میکنند)

گروه 5: گروه تیمار 24 ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 100 میلی گرم بر مول دریافت میکنند)

گروه 6: گروه تیمار 24 ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت 150 میلی گرم بر مول دریافت میکنند)

تست های آزمایشگاهی مختلف ذکر شده برای تمامی گروه ها به صورت تریپلیکیت انجام شد.

3-7- روش جمع آوری و تجزیه و تحلیل داده ها: داده های بدست آمده با برنامه نرم افزاری SPSS و به کمک آزمونهای آماری ANOVA در گروههای مورد مطالعه، تعیین و داده ها از نظر آماری با تستهای پارامتری و ناپارامتری مورد بررسی قرار گرفت. داده های حاصل از آزمایشهای مربوط به تیمار سلولهای کشت شده در زمانها و غلظت های مختلف به دلیل توضیح نرمال با استفاده از آزمون پارامتری آنالیز واریانس (ANOVA) و سپس به کمک آزمونهای تعقیبی Post Hoc مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بر این اساس تمامی نتایج که در آنها $p \text{ Value} < 0,05$ بود معنی دار تلقی گردید و نتایج با $p \text{ Value} > 0,05$ معنی دار محسوب نگردید. همچنین برای اطمینان بیشتر، از آزمونهای ناپارامتری نیز جهت آنالیز داده ها استفاده گردید.

فصل چهارم

نتایج و یافته ها

1-4- نتایج مربوط به محتویات عصاره اتانولی و عصاره آبی گیاه گل راعی:

همانطور که در جدول 1-4 مشاهده می شود مقادیر فنولیک، فلاونوئید و آنتی اکسیدان عصاره اتانولی در مقایسه با عصاره آبی افزایش معنی داری را نشان می دهد. همچنین مقدار کاهش توان عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی افزایش معنی داری دارد. هر کدام از اعداد بدست آمده در جدول میانگینی از سه آزمایش با محاسبه انحرافات آنها می باشد.

جدول 1-4: مقادیر فنولیک، فلاونوئید و آنتی اکسیدان عصاره آبی و عصاره اتانولی گیاه گل راعی

| نوع | مقدار فنولیک (mg GAL/g) | مقدار فلاونوئید (QE/g) | آنتی اکسیدان فعال (mg/ml) | آنتی اکسیدان Mg/l | مقدار کاهش توان % |
|------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|
| عصاره آبی | 23,95±3,5 | 10,23±2,5 | 42,4±2,11 | 696,32±36,65 | 0,508 |
| عصاره اتانولی | 35,35±4,5 | 11,89±1,77 | 55,4±2,15 | 1498±89,96 | 2,090 |

4-2- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو مربوط به تیمار 24 ساعته عصاره گیاه گل راعی:

نتایج مربوط به توانایی زیستی سلولها در گروه های مورد مطالعه مربوط به زمان تیمار 24 ساعته در جدول 2-4 و نمودار 4-1 و 4-2 مشاهده می شود. این نتایج نشان می دهد که توانایی زیستی در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروهها (گروههای با غلظتهای 25، 50، 100 و 150 میلی گرم بر میلی لیتر) معنی دار میباشد ($P < 0,05$). همچنین گروه با غلظت 25 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروهها معنی دار می باشد ($P < 0,05$). گروه با غلظت 50 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت 100 و 150 میلی گرم بر لیتر معنی دار نمی باشد ($P > 0,05$). گروه با غلظت 100 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروههای با غلظت 50 و 150 میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار نمی باشد ($P > 0,05$). همچنین گروه با غلظت 150 میلی گرم بر میلی لیتر تنها نسبت به گروه با غلظت 25 میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار می باشد ($P < 0,05$).

جدول 4-2:

نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو مربوط به تیمار 24 ساعته عصاره

گیاه گل راعی

| غلظت عصاره الکلی گل راعی (تیمار 24 ساعته) | گروه کنترل (بدون دریافت عصاره) | 25 mg/ml | 50 mg/ml | 100mg/ml | 150mg/ml |
|---|---|------------|-----------|-----------|-------------|
| درصد زنده ماندن [تعداد سلولهای زنده به تعداد کل سلولها] (توانایی زیستی سلولها) | 82,39±7,4 | 56,35±12,6 | 43,9±8,35 | 40,95±9,9 | 37,97±10,26 |

4-3- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو 36 ساعته عصاره گیاه گل راعی:

نتایج مربوط به توانایی زیستی سلولها در گروههای مورد مطالعه مربوط به زمان تیمار 36 ساعته در جدول 3-4 و نمودار 1-4 و 2-4 مشاهده میشود این نتایج نشان می دهد که توانایی زیستی در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروهها (گروههای با غلظتهای 100، 50، 25 و 150 میلی گرم بر میلی لیتر) معنی دار میباشد ($P < 0,05$). گروه با غلظت 25 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت 50 میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار نمی باشد ($P > 0,05$) و نسبت به سایر گروهها معنی دار می باشد ($P < 0,05$). گروه با غلظت 50 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت 150 میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار ($P < 0,05$) و نسبت به گروه با غلظت 100 و 25 میلی گرم بر میلی لیتر معنی نمی باشد ($P > 0,05$). گروه با غلظت 100 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت 150 میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار نمی باشد ($P > 0,05$) همچنین گروه با غلظت 150 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه با غلظت 100 میلی گرم بر میلی لیتر معنی دار نبوده ($P > 0,05$) و نسبت به سایر گروهها معنی دار می باشد ($p < 0,05$)

جدول 3-4:

نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست تریپان بلو 36 ساعته عصاره گیاه گل راعی

| غلظت عصاره الکلی گل راعی (تیمار 36 ساعته) | گروه کنترل (بدون دریافت عصاره) | 25 mg/ml | 50 mg/ml | 100mg/ml | 150mg/ml |
|---|-----------------------------------|------------|----------|-------------|-------------|
| درصد زنده ماندن [تعداد سلولهای زنده به تعداد کل سلولها] (توانایی زیستی سلولها) | 71,6±9,4 | 54,5±12,38 | 50,15±13 | 38,29±10,57 | 34,35±11,84 |

4-4- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار 24 ساعته
عصاره گیاه گل راعی:

نتایج مربوط به توانایی زیستی سلولها در گروههای مورد مطالعه مربوط به زمان تیمار 24 ساعته، در جدول 4-4 مشاهده می شود. این نتایج نشان می دهد که توانایی زیستی در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروهها (گروههای با غلظتهای 150، 100، 50، 25 میلی گرم بر میلی لیتر) معنی دار میباشد ($P < 0,05$). گروه با غلظت 25 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروهها معنی دار می باشد ($P < 0,05$). گروه با غلظت 50 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروهها معنی دار می باشد ($P < 0,05$) و گروه با غلظت 100 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروهها معنی دار می باشد ($P < 0,05$) و نهایتاً گروه با غلظت 150 میلی گرم بر میلی لیتر نیز نسبت به سایر گروههای مذکور معنی دار می باشد ($P < 0,05$).

جدول 4-4:

نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار 24 ساعته عصاره گیاه گل راعی

| غلظت عصاره الکلی گل راعی (تیمار 24 ساعته) | گروه کنترل (بدون دریافت عصاره) | 25 mg/ml | 50 mg/ml | 100mg/ml | 150mg/ml |
|--|---|------------|----------|-----------|-------------|
| درصد زنده ماندن (توانایی زیستی سلولها) | 82,39±7 | 56,35±12,6 | 43,9±8,3 | 40,95±9,9 | 37,97±10,26 |

4-5- نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار 36 ساعته
 عصاره گیاه گل راعی: نتایج مربوط به توانایی زیستی سلول ها در گروه های مورد مطالعه مربوط به زمان تیمار 36 ساعته در جدول 4-5 مشاهده می شود این نتایج نشان می دهد که توانایی زیستی در گروه کنترل در مقایسه با سایر گروهها (گروههای با غلظتهای 25، 50، 100 و 150 میلی گرم بر میلی لیتر) معنی دار میباشد ($P<0,05$). گروه با غلظت 25 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروهها معنی دار می باشد ($P<0,05$). گروه با غلظت 50 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروهها معنی دار می باشد ($P<0,05$). گروه با غلظت 100 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروهها معنی دار ($P<0,05$) و نهایتا گروه با غلظت 150 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به سایر گروهها معنی دار می باشد ($P<0,05$).

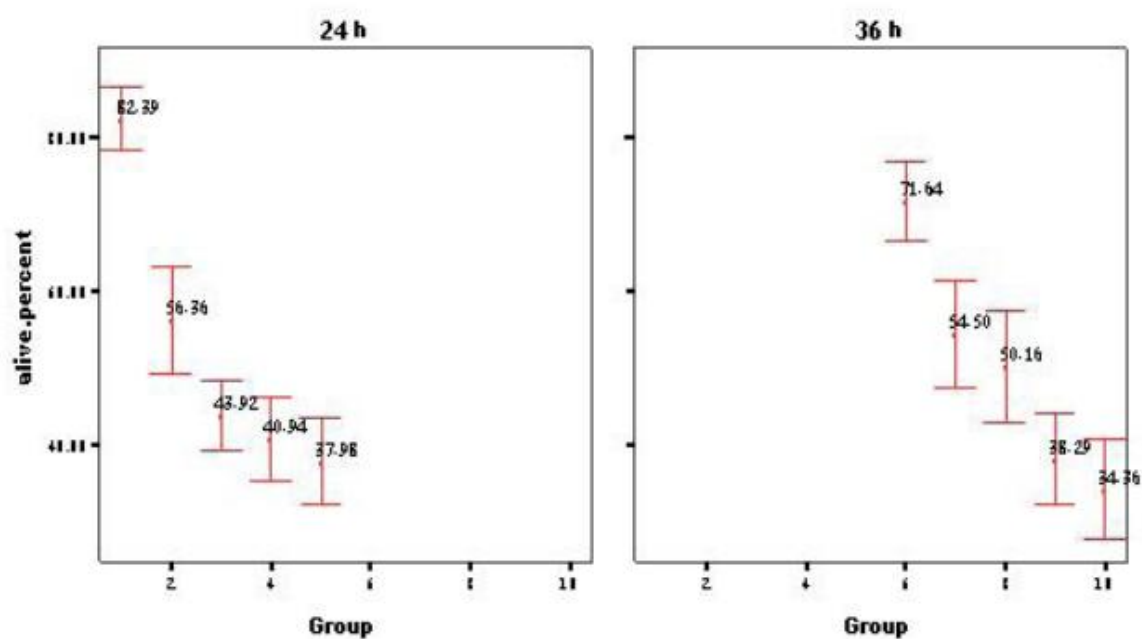
جدول 4-5:

نتایج مربوط به بررسی توانایی زیستی سلولها در تست MTT مربوط به تیمار 36 ساعته عصاره گیاه

گل راعی

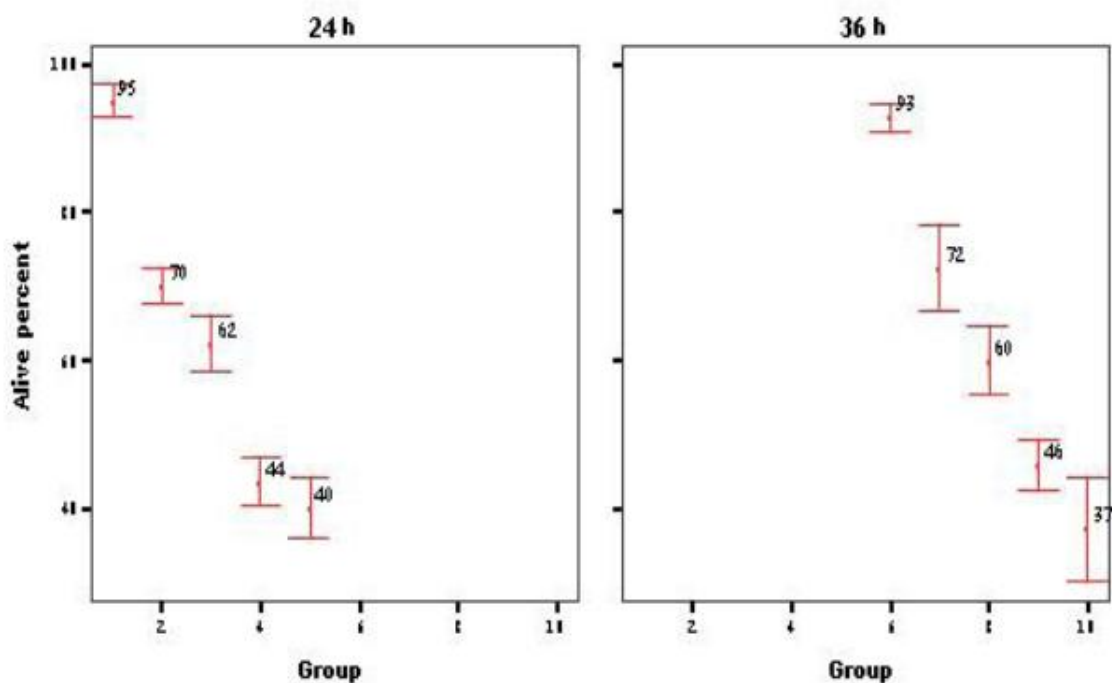
| غلظت عصاره الکلی گل راعی (تیمار 36 ساعته) | گروه کنترل (بدون دریافت عصاره) | 25 mg/ml | 50 mg/ml | 100mg/ml | 150mg/ml |
|--|---|------------|----------|-----------|-------------|
| درصد زنده ماندن (توانایی زیستی سلولها) | 82,39±7 | 56,35±12,6 | 43,9±8,3 | 40,95±9,9 | 37,97±10,26 |

در نمودار 1-4 نشان داده شده که غلظت 25 میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به غلظت 150 میلی گرم بر میلی لیتر همپوشانی ندارد در نتیجه تفاوت بین آنها معنی دار می باشد اما در غلظت های نزدیک به هم مثل 50 و 100 میلی گرم بر میلی لیتر همپوشانی زیادی مشاهده می شود که نشان می دهد تفاوت معنی دار نیست.



تصویر 1-4: مربوط به تست تریپان بلوبا غلظت متغیر عصاره گیاه گل راعی

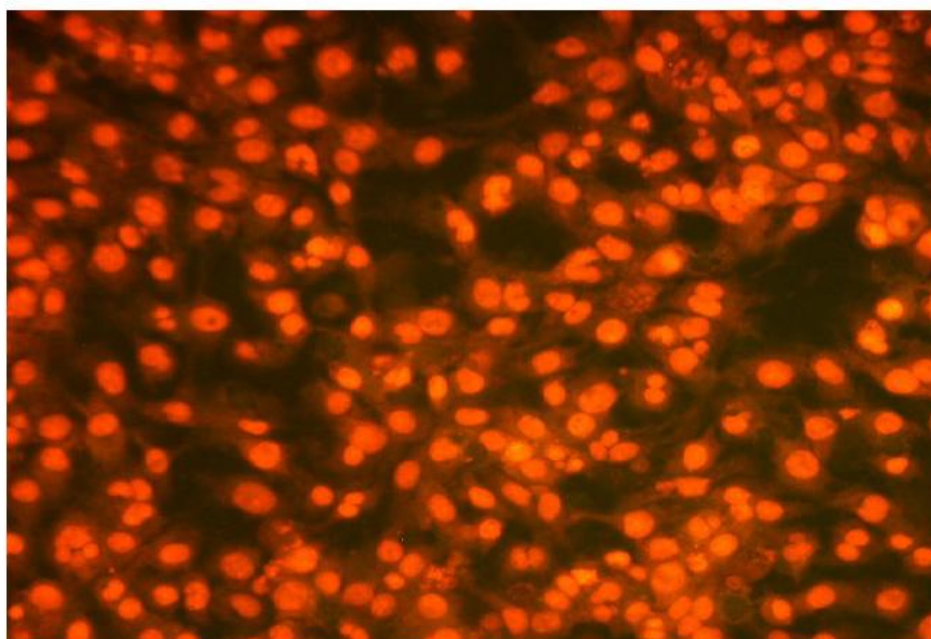
در نمودار 2-4 نشان داده شده که زمان در نظر گرفته شده برای غلظت 25 میلی گرم بر میلی لیتر در 24 ساعت نسبت به غلظت 25 میلی گرم بر میلی لیتر در 36 ساعت همپوشانی دارد در نتیجه تفاوت بین آنها معنی دار نمی باشد که این همپوشانی در باقی غلظت ها هم دیده می شود در نتیجه زمان 24 و 36 ساعت تفاوت چشمگیری نسبت به هم ندارد.



تصویر 2-4: مربوط به تست شمارش سلولی تریپان بلو زمان متغیر عصاره گیاه گل راعی

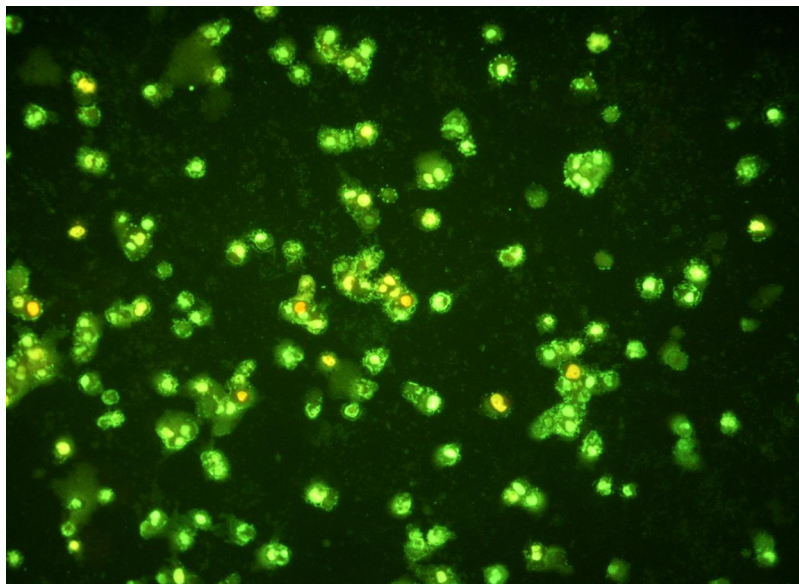
4-6- نتایج بررسی میزان آپتوز در سلولهای 4T1:

شکل 4-1 مربوط به گروه یک (گروه کنترل منفی) می باشد که هنوز تیمار انجام نشده است. همانطور که مشاهده می شود تمام سلولها سرطانی و به رنگ قرمز می باشند. شکل 4-2 برای تعیین صحت عملکرد کیت آزمایشگاه می باشد که قبل از اضافه کردن مخلوط واکنشی TUNEL، به سلولها آنزیم DNase اضافه کرده و همانگونه که مشاهده می شود سلولها به رنگ سبز در آمده اند و دچار آپتوز شده اند در نتیجه کیت آزمایشگاهی سالم می باشد. شکل 4-3، 4-4، 4-5 و 4-6 مربوط به تیمار 24 ساعته می باشد در واقع سلولهای سرطانی 4T1 تحت تاثیر عصاره اتانولی گل راعی با غلظت های 25، 50، 100 و 150 میلی گرم بر لیتر قرار گرفته اند و همانطور که مشاهده می شود سلولهایی که به رنگ سبز در آمده اند دچار آپتوز شده اند. نکته قابل توجه این است که با افزایش غلظت عصاره، سلولهای بیشتری دچار آپتوز شده اند.



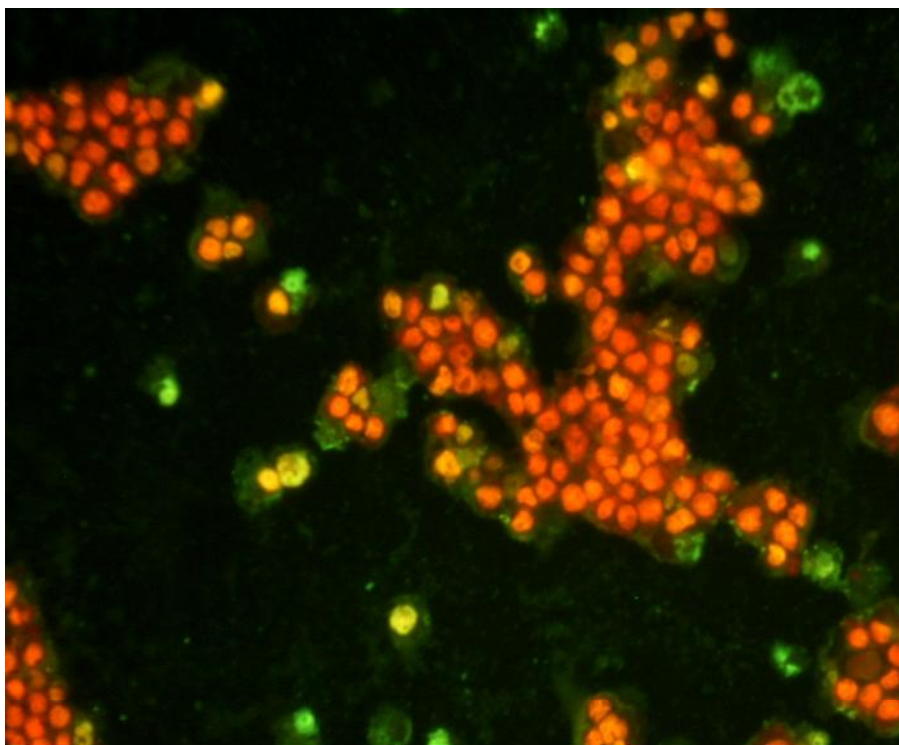
گروه ۱، کنترل منفی: سلولهای 4T1 بدون تیمار، که تمام سلولها سرطانی و به رنگ قرمز هستند.

شکل 4-3



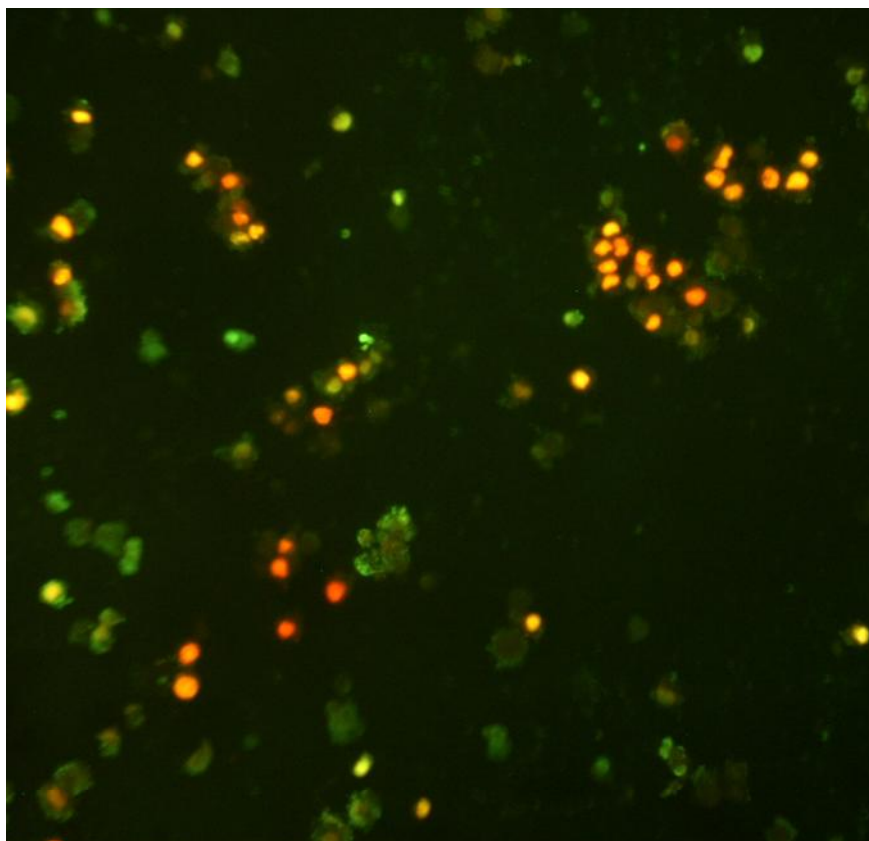
گروه ۲، کنترل مثبت: سلول های 4T1 مواجهه شده با آنزیم DNase قبل از افزودن مخلوط واکنشی
TUNEL سلول های نشان داده شده به رنگ سبز دچار آپتوز شده اند
(برای آزمایش صحت عملکرد کیت آزمایشگاه)

شکل 4-4



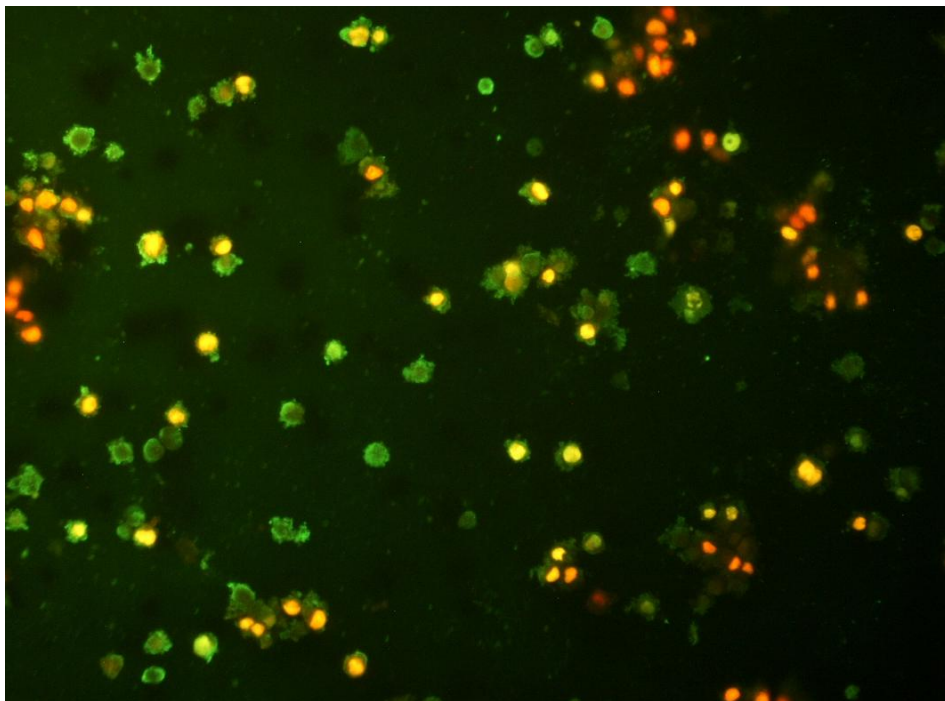
گروه ۳، تیمار ۲۴ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت ۲۵ mg/ml دریافت کردند) سلول های نشان داده شده به رنگ سبز بعد از دریافت عصاره با غلظت ۲۵ آپتوز کرده اند

شکل 4-5



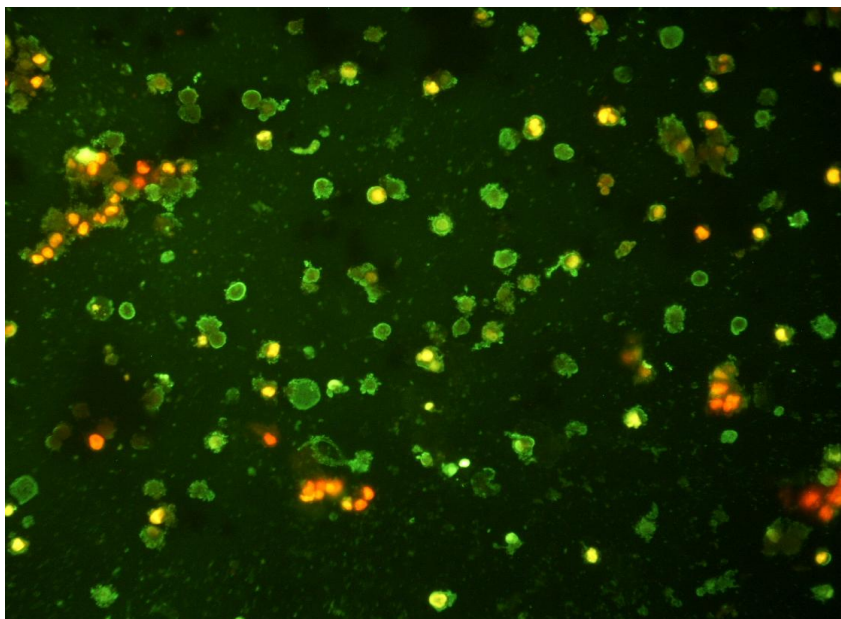
گروه ۴، تیمار ۲۴ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت ۵۰ mg/ml دریافت کردند سلول های نشان داده شده به رنگ سبز بعد از دریافت عصاره با غلظت ۵۰ آپیتوز کرده اند)

شکل 4-6



گروه ۵، تیمار ۲۴ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت ۱۰۰ mg/ml دریافت کردن سلول های نشان داده شده به رنگ سبز بعد از دریافت عصاره با غلظت ۱۰۰ آپا تئوز کرده اند)

شکل 4-7



گروه ۶، تیمار ۲۴ ساعته (سلول هایی که عصاره با غلظت ۱۵۰ mg/ml دریافت کردند سلول های نشان داده شده به رنگ سبز بعد از دریافت عصاره با غلظت ۱۵۰ آپایتوز کرده اند)

شکل 4-8

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

5-1- بحث مربوط به تغییرات غلظت در تاثیر عصاره گل بر سلول های سرطانی 4T1:

بررسی سلول های سرطانی در سه تست TUNEL و MTT و تریپان بلو نشان داد که اگر بازه زمان را ثابت و غلظت ها را متغیر در نظر بگیریم سلول های سرطانی در غلظت 25 میلی گرم بر میلی لیتر تا اندازه ای دچار آپتوز می شوند اما این مقدار آپتوز با افزایش میزان غلظت رو به افزایش مینهد به طوری که آمار نشان می دهد آپتوز سلولی در غلظت 25 نسبت به 50 و در غلظت 50 نسبت به 100 و 100 نسبت به غلظت 150 کمتر اتفاقی افتاده به بیانی دیگر هرچه غلظت عصاره گل راعی افزایش یابد میزان آپتوز سلولی کنسر های برست هم افزایش می یابد تا جایی که در غلظت 150 میلی گرم بر میلی لیتر با بیشترین میزان آپتوز سلولی مواجه هستیم. همچنین در نمودار 4-1 نشان داده شده که غلظت 25 نسبت به 150 همپوشانی ندارد در نتیجه تفاوت بین آنها معنی دار می باشد اما در غلظت های نزدیک به هم مثل 50 و 100 میلی گرم بر میلی لیتر همپوشانی زیادی مشاهده می شود که نشان می دهد تفاوت معنی دار نیست.

5-2- بحث مربوط به تغییرات زمان در تاثیر عصاره گل راعیبر سلول های سرطانی 4T1:

عصاره گیاه گل راعی بر روی سلول های سرطانی در دو زمان 24 و 36 ساعت آزمایش شد. به طوری که در این آزمایش در هر کدام از پلیت ها غلظت ها ثابت در نظر گرفته شد و زمان متغیر بود در این آزمایش نتایج به دست آمده در آپتوز سلول ها تفاوت چشمگیری نسبت به افزایش زمان نداشت. در نمودار 4-2 نشان داده شده که زمان در نظر گرفته شده برای غلظت 25 در 24 ساعت نسبت به غلظت 25 در 36 ساعت همپوشانی دارد در نتیجه تفاوت بین آنها معنی دار نمی باشد که این همپوشانی در باقی غلظت ها هم دیده می شود در نتیجه زمان 24 و 36 ساعت تفاوت چشمگیری نسبت به هم نداشته و می توان متغیر زمان را کاهش داد.

5-3- نتیجه گیری کلی:

نتیجه معلوم میکند که عصاره اتانولی گیاه گل راعی دارای محتوای بالاتری از فنولیک نسبت به عصاره آبی می باشد در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانتهی عصاره اتانولی، بیشتر از عصاره آبی بود. فعالیت سیتو توکسیسیتهی گیاه گل راعی در برابر سلول های کنسر برست وابسته به غلظت موثره مشخص شد. غلظت حدود 150 میلی گرم از عصاره دارای بالاترین اثر سیتو توکسیسیتهی روی سلول های 4T1 بود.

با توجه به نتایج بدست آمده، آشکار میشود که فلاونوئید و پلی فنول نقش مهمی را در خواص دارویی گیاه گل راعی ایفا میکند. نتایج همچنین اثر بالاتری از سیتو توکسیسیتهی 150 میلی گرم از عصاره گیاه را بر ضد سلولهای سرطانی 4T1 نشان می دهد. بنابراین گیاه دارویی گل راعی دارای خاصیت ضد سرطانی در سرطان پستان میباشد

5-4- پیشنهادات:

با توجه به نتایج مطالعه حاضر موارد زیر را برای مطالعه بعدی پیشنهاد می‌کنم:

با توجه به اینکه غلظت 25 میلی گرم بر میلی لیتر موثر بود و باعث آپتوز سلول های سرطانی شد، پس میتوان از عصاره گیاه در دوزاژ کمتر هم بهره برد.

زمان 24 و 36 ساعت تفاوت چشمگیری نسبت به هم نداشتند پس میتوان متغیر زمان را کاهش داد

میتوان تاثیر عصاره گیاه گل راعی را روی سلولهای غیر سرطانی در بیماران مبتلا به سرطان بررسی کرد.

فصل ششم

منابع مورد مطالعه

منابع فارسی

- 1-سایت مرکز تحقیقات درمان سرطان های توپر
- 2-زرگری،ع،1362،گیاهان دارویی،جلد اول انتشارات دانشگاه تهران
- 3-امید بیگی، ر،1374،رهیافتهای تولید و فرآوری گیاهان دارویی،انتشارات فکر روز
- 4-ف،میرزا،م،1377،تحقیقات گیاهان دارویی و معطر،جلد اول،انتشارات جنگل ها و مراتع
- 5-نقد آبادی،ح ضیایی،1383،فصلنامه گیاهان دارویی،شماره 11،پژوهشکده گیاهان دارویی و فرآورده های طبیعی جهاد کشاورزی
- 6-میر حیدر،ح،1375،معارف گیاهی،جلد سوم انتشارات نشر اسلامی
- 7-لابراتوار داروسازی گل و دارو
- 8-لباسچی،م،شریفی،1380،تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران،جلد11،انتشارات موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع
- 9-ولاگ،ژ-استودولا،ترجمه زمان،س،1374،انتشارات ققنوس
- 10-صمصام شریعت،ه،1382،پرورش و تکثیر گیاهان دارویی،انتشارات مانی
- 11-یزدانی،د،1380،کاشت داشت و برداشت گیاهان دارویی،جهاد دانشگاهی
- 12-واحد تحقیق و توسعه باریج اسانس،1381،شماره 610سفید کن

منابع انگلیسی

13. Pliny the Elder (23-79 A.D.). The natural history. Book XXVI, Chapter LXXX. Cited after: Bostock J, Riley HT, editors. London: Taylor and Francis; 1800. The perseus digital library. Available at: <http://www.perseus.tufts.edu/hopper/text?doc=Perseus%20text%20a%201999.02.0137> Accessed April 0, 2013

14. Blaschek W, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U, Keller K, Reichling J, Schulz V. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 2008

15. WHO. WHO-Monographs on selected medical plants. Geneva: World Health Organization; 2002

16. EMEA (European Medicines Agency). HMPC Community herbal monograph on *Hypericum perforatum* L., herba (Traditional use). EMEA/HMPC/450082/2009. Wien Med Wochenschr 2010; 160: 507-513

17. Isacchi B, Bergonzi MC, Carnevali F, van der Esch SA, Vincieri FF, Bilia AR. Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods. J Pharm Biomed Anal 2007; 45: 706-711

18. German Pharmacopoeia, EB6 (Deutsches Arzneibuch. Suppl., 6th edition). Bonn: Phytopharmaceutical Corporation; 1991: 409

19. Schmidt AH. Use of an on-line, precolumn photochemical reactor in high-performance liquid chromatography of naphthodianthrone in *Hypericum perforatum* preparations. J Chromatogr A 2003; 987: 181-187

20. Maisenbacher P, Kovar KA. Analysis and stability of *Hyperici oleum*. Planta Med 1992; 58: 301-304

21. Verotta L, Appendino G, Jakupovic J, Bombardelli E. Hyperforin analogues from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). J Nat Prod 2000; 63: 412-415

22. Arsić I, Zugić A, Tadić V, Tasić-Kostov M, Mišić D, Primorac M, Runjaić-Antić D. Estimation of dermatological application of creams with St. John's Wort oil extracts. Molecules 2011; 17: 270-294

23. Orhan IE, Kartal M, Gülpinar AR, Cos P, Matheeußen A, Maes L, Tasdemir D. Assessment of antimicrobial and antiprotozoal activity of the olive oil macerate samples of *Hypericum perforatum* and their LC-DAD-MS analyses. Food Chem 2013; 138: 870-875

24. EMEA (European Medicines Agency). HMPC assessment report on *Hypericum perforatum* L., Herba. EMA/HMPC/101303/2008. London: EMEA; 2009

25. Gaedcke F. Herstell- und Qualitätsaspekte pflanzlicher Extrakte. Pharmazie in unserer Zeit 2003; 3: 192-202
26. Kacerovská D, Pizinger K, Majer F, Smíd F. Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical *Hypericum perforatum* extract—a pilot study. Photochem Photobiol 2008; 84: 779-780
27. Tardivo JP, Wainwright M, Baptista MS. Local clinical phototreatment of herpes infection in São Paulo. Photodiagnosis Photodyn Ther 2012; 9: 118-121
28. Schempp CM, Lüdtke R, Winghofer B, Simon JC. Effect of topical application of *Hypericum perforatum* extract (St. John's wort) on skin sensitivity to solar simulated radiation. Photodermatol Photoimmunol Photomed 2000; 16: 120-128
29. Schempp CM, Windeck T, Hezel S, Simon JC. Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream – a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison. Phytomedicine 2003; 10 (Suppl. 4) 31-37
30. Cecchini C, Cresci A, Coman MM, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, Lucarini D, Maggi F. Antimicrobial activity of seven *Hypericum* entities from central Italy. Planta Med 2007; 73: 564-566
31. Gibbons S, Ohlendorf B, Johnsen I. The genus *Hypericum* – a valuable resource of anti-Staphylococcal leads. Fitoterapia 2002; 73: 300-304
32. Bystrov NS, Dobrynin VN, Kolosov MN, Chernov BK, Chervin IL. [Structure of the chromophoric part of hyperforin]. Dokl Akad Nauk SSSR 1970; 220: 1327-1328
33. Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schöpf E, Simon JC. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. Lancet 1999; 353: 2129
34. Yow CM, Tang HM, Chu ES, Huang Z. Hypericin-mediated photodynamic antimicrobial effect on clinically isolated pathogens. Photochem Photobiol 2012; 88: 626-632
35. Borchardt JR, Wyse DL, Sheaffer CC, Kauppi KL, Fulcher RG, Ehlke NG, Bicsboer DD, Bey RF. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. J Med Plants Res 2008; 2: 98-110
36. Avato P, Raffo F, Guglielmi G, Vitali C, Rosato A. Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity. Phytother Res 2004; 18: 230-232
37. Dadgar T, Asmar M, Saifi A, Mazandarani M, Bayat H, Moradi A, Bazueri M, Ghaemi E. Antibacterial activity of certain medicinal plants against methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* . Asian J Plant Sci 2006; 5: 861-866

38. Lasik M, Nowak J, Stachowiak B, Czarnecki Z. Evaluation of the antagonistic properties of natural antibacterial substances extracted from herbs: poster presentation. Eurobiotech 2007; 04: 10 (cited after Saddiqe 2010)
39. Reichling J, Weseler A, Saller R. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. Pharmacopsychiatry 2001; 32 (Suppl. 01) S116-S118
40. Mortensen T, Shen S, Shen F, Walsh MK, Sims RC, Miller CD. Investigating the effectiveness of St John's wort herb as an antimicrobial agent against *Mycobacteria* . Phytother Res 2012; 26: 1327-1333
41. Peeva-Naumovska V, Panovski N, Grdanovska T, Fredro-Kumbaradzi E. Formulations of St. John's Wort oil ointment and evaluation of its antibacterial effect. Available at <http://www.amapseec.org/cmapseec.1/papers/pap-p.67.htm> 2000. Accessed April 28, 2013
42. Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. J Ethnopharmacol 2010; 131: 511-521
43. Birt DF, Widrlechner MP, Hammer KD, Hillwig ML, Wei J, Kraus GA, Murphy PA, McCoy J, Wurtele ES, Neighbors JD, Wiemer DF, Maury WJ, Price JP. *Hypericum* in infection: Identification of anti-viral and anti-inflammatory constituents. Pharm Biol 2009; 47: 774-782
44. Klemow KM, Bartlow A, Crawford J, Kocher N, Shah J, Ritsick M. Medical attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects. 2nd edition. Boca Raton: CRC Press; 2011. (Chapter 11)
45. Takahashi I, Nakanishi S, Kobayashi E, Nakano H, Suzuki K, Tamaoki T. Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity. Biochem Biophys Res Commun 1989; 160: 1207-1212
46. Gulick RM, McAuliffe V, Holden-Wiltse J, Crumpacker C, Liebes L, Stein DS, Meehan P, Hussey S, Forcht J, Valentine FT. Phase I studies of hypericin, the active compound in St. John's Wort, as an antiretroviral agent in HIV-infected adults. AIDS Clinical Trials Group Protocols 100 and 208. Ann Intern Med 1999; 130: 510-514
47. Maury W, Price JP, Brindley MA, Oh C, Neighbors JD, Wiemer DF, Wills N, Carpenter S, Hauck C, Murphy P, Widrlechner MP, Delate K, Kumar G, Kraus GA, Rizshsky L, Nikolau B. Identification of light-independent inhibition of human immunodeficiency virus-1 infection through bioguided fractionation of *Hypericum perforatum* . Virol J 2009; 6: 101
48. López-Chicón P, Paz-Cristobal MP, Rezusta A, Aspiroz C, Royo-Cañas M, Andres-Ciriano E, Gilaberte Y, Agut M, Nonell S. On the mechanism of *Candida* spp. photoinactivation by hypericin. Photochem Photobiol Sci 2012; 11: 1099-1107

49. Khosa RL, Bhatia N. Antifungal effect of *Hypericum perforatum* Linn. J Sci Res Plant Med 1982; 3: 49-50.
50. Hunt EJ, Lester CE, Lester EA, Tackett RL. Effect of St. John's wort on free radical production. Life Sci 2001; 69: 181-190.
51. Benedi J, Arroyo R, Romero C, Martin-Aragon S, Villar AM. Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. Life Sci 2004; 75: 1263-1276.
52. Jang MH, Lee TH, Shin MC, Bahn GH, Kim JW, Shin DH, Kim EH, Kim CJ. Protective effect of *Hypericum perforatum* Linn (St. John's wort) against hydrogen peroxide-induced apoptosis on human neuroblastoma cells. Neurosci Lett 2002; 329: 177-180.
53. Sagratini G, Ricciutelli M, Vittori S, Oztürk N, Oztürk Y, Maggi F. Phytochemical and antioxidant analysis of eight *Hypericum* taxa from Central Italy. Fitoterapia 2008; 79: 210-213.
54. Rainha N, Lima E, Baptista J. Comparison of the endemic Azorean *Hypericum foliosum* with other *Hypericum* species: antioxidant activity and phenolic profile. Nat Prod Res 2011; 25: 123-130.
55. Zou Y, Lu Y, Wei D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro* . J Agric Food Chem 2004; 52: 5032-5039.
56. Meinke MC, Schanzer S, Haag SF, Casetti F, Müller ML, Wölfl U, Kleemann A, Lademann J, Schempp CM. *In vivo* photoprotective and anti-inflammatory effect of hyperforin is associated with high antioxidant activity *in vitro* and ex vivo. Eur J Pharm Biopharm 2012; 81: 346-350.
57. Onoue S, Seto Y, Ochi M, Inoue R, Ito H, Hatano T, Yamada S. *In vitro* photochemical and phototoxicological characterization of major constituents in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts. Phytochemistry 2011; 72: 1814-1820.
58. Schempp CM, Müller K, Winghofer B, Schulte-Mönting J, Simon JC. Single-dose and steady-state administration of *Hypericum perforatum* extract (St John's Wort) does not influence skin sensitivity to UV radiation, visible light, and solar-simulated radiation. Arch Dermatol 2001; 137: 512-513.
59. Traynor NJ, Beattie PE, Ibbotson SH, Moseley H, Ferguson J, Woods JA. Photogenotoxicity of hypericin in HaCaT keratinocytes: implications for St. John's Wort supplements and high dose UVA-1 therapy. Toxicol Lett 2005; 158: 220-224.
60. Schmitt LA, Liu Y, Murphy PA, Petrich JW, Dixon PM, Birt DF. Reduction in hypericin-induced phototoxicity by *Hypericum perforatum* extracts and pure compounds. J Photochem Photobiol B 2006; 85: 118-120.

٦١. Boiy A, Roelandts R, van den Oord J, de Witte PA. Photosensitizing activity of hypericin and hypericin acetate after topical application on normal mouse skin. *Br J Dermatol* ٢٠٠٨; ١٥٨: ٣٦٠-٣٦٩
٦٢. Sosa S, Pace R, Bornancin A, Morazzoni P, Riva A, Tubaro A, Della Loggia R. Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L. *J Pharm Pharmacol* ٢٠٠٧; ٥٩: ٧٠٣-٧٠٩
٦٣. Kang BY, Chung SW, Kim TS. Inhibition of interleukin-١٢ production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages by hypericin, an active component of *Hypericum perforatum*. *Planta Med* ٢٠٠١; ٦٧: ٣٦٤-٣٦٦
٦٤. Albert D, Zündorf I, Dingermann T, Müller WE, Steinhilber D, Werz O. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-١ and ٢-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* ٢٠٠٢; ٦٤: ١٧٦٧-١٧٧٥
٦٥. Hammer KD, Hillwig ML, Solco AK, Dixon PM, Delate K, Murphy PA, Wurtele ES, Birt DF. Inhibition of prostaglandin E(٢) production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW٢٦٤,٧ Mouse Macrophage Cells. *J Agric Food Chem* ٢٠٠٧; ٥٥: ٧٣٢٣-٧٣٣١
٦٦. Koeberle A, Rossi A, Bauer J, Dehm F, Verotta L, Northoff H, Sautebin L, Werz O. Hyperforin, an Anti-Inflammatory Constituent from St. John's Wort, Inhibits Microsomal Prostaglandin E(٢) Synthase-١ and Suppresses Prostaglandin E(٢) Formation *in vivo*. *Front Pharmacol* ٢٠١١; ٢: ٧
٦٧. Feisst C, Pergola C, Rakonjac M, Rossi A, Koeberle A, Dodt G, Hoffmann M, Hoernig C, Fischer L, Steinhilber D, Franke L, Schneider G, Rådmark O, Sautebin L, Werz O. Hyperforin is a novel type of ٢-lipoxygenase inhibitor with high efficacy *in vivo*. *Cell Mol Life Sci* ٢٠٠٩; ٦٦: ٢٧٥٩-٢٧٧١
٦٨. Heilmann J, Winkelmann K, Sticher O. Studies on the antioxidative activity of phloroglucinol derivatives isolated from *Hypericum* species. *Planta Med* ٢٠٠٣; ٦٩: ٢٠٢-٢٠٦
٦٩. Cabrelle A, Dell'Aica I, Melchiori L, Carraro S, Brunetta E, Niero R, Scquizzato E, D'Intino G, Calzà L, Garbisa S, Agostini C. Hyperforin down-regulates effector function of activated T lymphocytes and shows efficacy against Th١-triggered CNS inflammatory-demyelinating disease. *J Leukoc Biol* ٢٠٠٨; ٨٣: ٢١٢-٢١٩
٧٠. Gartner M, Muller T, Simon Jc, Giannis A, SLEEMAN JP. Aristoforin a novel stable derivative of hyperforin is a potent anti cancer agent. ٢٠٠٦ jan, ٦(١): ١٧١-٧
٧١. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart. New York TOPICAL Application of st. Johnswort plant a med ٢٠١٤, ٨٠(٠٢/٠٣): ١٠٩-١٢٠

٧٢.Chon su,Heobg,parkYs.KimDK,Gorinsteins.Totalphenolicslevel,antioxidant activities and Cytotoxic of Young sprouts of some traditional Korean salad plants.plant foods Hum nutr.٢٠٠٩ Mar,٦٤(١):٢٥-٣١ doc:١٠,١٠٠٧/s١١١٣٠-٠٠٨-٠٠٩٢-x

٧٣.Dimitrioskalkos,Nikolaose.savripoulos.lipophilic extracts of hypericumperforatum for the therapy of cancer.patentep ١٥٢٢٣٠٩ a١.Apr ١٣,٢٠٠٥

٧٤.BrittaKleemann,BenjaminLoos,ThomasJ,Scriba,Dirklang,lesterM.Davids.Hypericin-Photodynamic Therapy Tnduces Metastatic melanoma cell Death.Julu ٣٠,٢٠١٤

Abstract:

Herbal and traditional medicine has been developed in recent years. Nowadays it is very desirable to investigate new anticancer agents from natural products. The natural products obtained from organisms such as medicinal plants that is called secondary metabolites, are known as a powerful source to supplement therapy and prevention of cancer. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity effects of *Hypericum perforatum* L. secondary metabolites on one of the cancerous cell lines. Therefore, after collecting and drying the samples, extraction process was done by water and ethanol. 4T1 cancer cell lines were incubated with different concentrations of ethanol extract for 24 and 36 hours and cell growth inhibition was determined using MTT and TUNEL assay. All the data were analyzed by SPSS 11 software by one-way ANOVA. In all the analyses $P < 0.05$ was considered significant. Results of MTT and TUNEL assay showed dose-dependent inhibition of cancer cell growth by ethanolic extract of *Hypericum perforatum* L. This extract caused a significant decrease in proliferation of treated cancer cell lines. These results revealed that the ethanolic extract of *Hypericum perforatum* L. possess significant anticancer activity.